

Série A, N° 4.653
N° d'ordre : 5.500

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Paul ROSSIGNOL

1^{re} THÈSE :

ACTION DES SAPONINES SUR LES CARACTÉ-
RISTIQUES FONCTIONNELLES DE DIVERS TYPES DE
TISSUS.

2^e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 21 avril 1958 devant la Commission d'examen

MM. SOULAIRAC	<i>Président</i>
LENORMANT	} <i>Examineurs</i>
JULIA M.	

I M P R I M E R I E
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1966

Série A, N° 4.653
N° d'ordre : 5.500

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Paul ROSSIGNOL

1^{re} THÈSE :

ACTION DES SAPONINES SUR LES CARACTÉRISTIQUES FONCTIONNELLES DE DIVERS TYPES DE TISSUS.

2^e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 21 avril 1958 devant la Commission d'examen

MM. SOULAIRAC	<i>Président</i>
LENORMANT	} <i>Examineurs</i>
JULIA M.	



IMPRIMERIE
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1966

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

BRELOT	T	Analyse supérieure	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées	CUVILLIER	T	Micropaléontologie
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés	JUNG	T	Géologie
PRÉVOST	T	Chimie organique	TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie	WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.
TEISSIER	T	Zoologie	JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)	VASSY	T	Physique de l'atmosphère
AUGER	T	Physique quantique et Relativité	DESTOUCHES ...	T	Théories physiques
MONNIER	T	Physiologie générale	AMIEL	T	Chimie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie	HOCART	T	Minéral. et Cristallogr.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)	J.-P. MATHIEU ..	T	Physique (Optique)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)	COUTEAUX	T	Cytologie
LAFFITTE	T	Chimie générale	MAY	T	Zoologie (Orsay)
N	T	Géométrie supérieure	CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
COULOMB	T	Physique du Globe	FELDMANN	T	Biologie végétale marine
Mlle COUSIN ...	T	Biologie anim. (S.P.C.N.)	GUINIER	T	Phys. des Solides (Orsay)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale	JOST	T	Physiologie comparée
BOCQUET	T	Zoologie	FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)	SCHWARTZ	T	Calcul différ. et Intégral
EPHRUSSI	T	Génétique	CHOUARD	T	Physiologie végétale
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédiment. (Orsay)	MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
GAUTHERET ...	T	Biologie végét. (P.C.B.)	NORMANT	T	Synthèse organique
R. LUCAS	T	Recherches physiques	BÉNARD	T	Chimie minérale
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire	BLIVAT	T	Botanique (E.N.S.)
ARNULF	T	Optique appliquée	DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques
MORAND	T	Physique Enseignement	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
SOLEILLET ...	T	Physique (P.C.B.)	ULRICH	T	Physiol. végét. appliquée
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée
DRACH	T	Zoologie	KIRRMANN	T	Théories chimiques
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique	CHADEFAUD	T	Botanique
GALLIEN	T	Embryologie	Mlle LE BRETON ..	T	Physiologie de la nutrition
EICHHORN	T	Botanique	LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DE CLIGNAC ...	T	Biologie végét. (S.P.C.N.)	DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie physique	EHRESMANN	T	Topologie algébrique
THELLIER	T	Physique du Globe	FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)	GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PONCIN	T	Mécanique générale	PISOT	T	Technique Mathém. de la Physique
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres	ROCH	T	Géologie
QUELET	T	Chimie organique	SCHATZMAN ..	T	Astrophysique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée	TERMIER	T	Géologie générale

ZAMANSKY	T	Mathématiques générales	Mme ALBE-		
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)	FESSARD	T	Psychophysiologie
RIZET	T	Génétique (Orsay)	FRIEDEL	T	Phys. des Solides (Orsay)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée	M. JULIA	T	Etudes des Moléculaires naturelles complexes
Mme TONNELAT	T	Physique théorique	LENDER	T	Biologie anim. (S.P.C.N., Orsay)
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)	MAGAT	T	Physico-chimie des radio- éléments
SOUCHAY	T	Chimie générale	Mlle QUINTIN ..	T	Electrochimie
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale	MONOD	T	Chimie du métabolisme
BRUSSET	T	Chimie systématique	BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay)
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)	DE POSSEL	T	Analyse numérique
Mme CHAIX ..	T	Chimie biologique	CHARLOT	T	Chimie analytique
Mme HUREL-PY.	T	Biologie végét. (P.C.B.)	LEMÉE	T	Ecologie végétale (Orsay)
PANNETIER	T	Chimie générale	GUÉRIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
BRUN	T	Mécanique théorique des fluides I	M. CHATELET ..	T	Chimie (P.C.B.)
LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay)	JEAN	T	Physique nucl. (Orsay)
Mme DUBREIL ..	T	Mathématiques (Agrég.)	MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.)
Mme LELONG ..	T	Mathémat. II (E.N.S.)	BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)	BERTEIN	T	Electronique (Orsay)
COTTE	T	Physique électricité	BOUSSIÈRES ..	T	Radiochimie
J.-E. DUBOIS ..	T	Chimie organique	Mme COUTURE ..	T	Thermodynamique et Mé- canique physique
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)	ELLENBERGER ..	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
A. MICHEL	T	Chimie minérale (Orsay)	FRANC	T	Biologie animale (P.C.B.)
OLMER	T	Energétique générale	SCHNELL		Botanique trop.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)	STOLKOWSKI ..	T	Physiologie végétale
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée	ACHER	T	Chimie biologique
BARCHEWITZ ..	T	Chimie physique	BAUDOIN	T	Biologie animale (P.C.B.)
BROSSEL	T	Physique atomique	BEAUMONT		Biologie anim. (S.P.C.N.)
BUSER	T	Physiologie comparée	BLAMONT		Géophysique Ionosphère
CAMUS	T	Physiol. végét.	BOURREAU	T	Botanique
CASTAING	T	Physique II Thermod. (Orsay)	D. CURIE		Physique (M.G.P.)
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallogra- phie	DURAND-DELGA ..	T	Géologie
MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay)	FREON	T	Chimie organ. (Orsay)
Mme CHARNIAUX-			HELLER	T	Physiologie végétale
COTTON	T	Evolution des êtres organ.	TORTRAT	T	Calcul des probabilités
POSSOMPS	T	Zoologie	CAILLEUX	T	Géologie (S.P.C.N.)
PULLMANN	T	Chimie quantique	MAGNAN		Physique électricité
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay)	DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Phy- sique nucléaire
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique	Mlle FOURCROY ..		Biologie végét. (S.P.C.N.)
VILLE	T	Econométrie	Mme CHOQUET-		
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.)	BRUHAT		Mécanique analytique et Mécanique céleste
DODE	T	Chimie (Orsay)	Mlle VEIL	T	Physiologie générale
FREYMANN	T	Recherches physiques	LWOFF	T	Microbiologie
GUINOCHE	T	Biol. végétale (S.P.C.N., Orsay)	SIESTRUNCK ..	T	Mécanique physique et expérimentale
ROLLET	T	Chimie minérale	LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
Mlle JOSIEN ..	T	Chimie (S.P.C.N.)	BROCHARD	T	Physique (P.C.B., Orsay)
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes	CABANNES	T	Mécanique générale
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)	LESIEUR	T	Mathématiques I (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay)	MAZET	T	Mécanique génér. (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay)	CAIRE		Géographie physique et Géologie dynamique
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)	COMOLET		Mécanique des fluides
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides	CORABGEUF	T	Physiologie anim. (Orsay)
G. LUCAS	T	Géologie	DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
ALLARD	T	Chimie physique	GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales (Orsay)			
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère			

HOUILLOIN		Biologie animale (P.C.B.)	CAMEFORT T	Botanique (agrégation)
J. JULLIEN		Chimie (S.P.C.N., Orsay)	VICHNIEWSKY .. T	Mécanique industrielle
MALGRANGE ... T		Tech. math. de la Physique (Orsay)	BLAQUIÈRE	Electronique (Orsay)
OLIVIER		Anthropologie	ARNOUS	T Physique théorique
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)	TATIBOUET	Chimie (C.S.U., Orléans)
BLANC-LAPIERRE ..	T	Physique E.N.S. (Orsay)	MALLIVIN	T Mathém. propé. (Orsay)
CHEVAUGEON ..	T	Botanique (Orsay)	GAUDEMAR	Chimie propédeutique
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)	PEREZ Y JORBA ..	Physique expé. des hautes énergies (Orsay)
SAMUEL	T	Math. E.N.S. féminines	DAVID	T Chimie (agrégat. Orsay)
KOURGANOFF ..	T	Astronomie (Orsay)	BROUSSE	T Mécanique théorique
THIRY	T	Mécanique céleste	ROSCH	T Astronomie
ABELES		Physique (S.P.C.N.)	GUY	T Physique expérimentale
AMAT	T	Physique (P.C.B.)	LAZARD	Mathématiques (M.P.C.)
AUBOIN	T	Géologie	P. MOREL	Physique (M.P.C.)
Mme BENOIT-GUEUTAL	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)	ARSAC	Programmation
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)	LEFEBVRE	Chimie (M.P.C.)
BRUHAT	T	Mathématiques (M.P.C.)	CHAPPEVILLE ..	Biochimie
BRUNN	T	Géologie histor. (Orsay)	BENOIT	Physique (C.P.E.M.)
CHABBAL	T	Physique (M.G.P., Orsay)	RIO	Chimie (C.P.E.M.)
DEHEUVELS ..	T	Mathémat. propé.	JAUZEIN	Géologie (E.N.S.)
D'ESPAGNAT ...	T	Physique théor. (Orsay)	G. PRÉVOST	B.V. (C.P.E.M.)
FURON	T	Géologie (S.P.C.N.)	P. FAVARD	B.A. (C.P.E.M.)
Mme GANS	T	Génétique	VILKAS	Chimie (C.P.E.M.)
GENEVES		Biologie végétale (P.C.B.)	Mlle FICINI	Chimie (C.P.E.M.)
GUILBERT		Physiq. (C.U.S., Orléans)	LEQUELIX	Astronomie
HUPE	T	Pétrographie	COHEN	
HOLLANDE	T	Biologie générale	TANNOUDJI ..	Physique (M.P.C.)
LIONS	T	Analyse numérique	TAVERNIER	Physique (C.P.E.M.)
MAITTE	T	Chimie (P.C.B.)	Mme ROIZEN ..	Physique (C.P.E.M.)
MEYER		Physique propédeutique	M. DURAND	B.A. (S.P.C.N.)
NICOLAS		Géologie appliquée	PASCAUD	Physiologie
PANIGEL		Biologie générale	Mme PETIT	B.A. (C.P.E.N.)
RAVIER		Pétrographie	BROUSSE	Géologie (Orsay)
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides	CAGNIAC	Physique agré. (Orsay)
ROUBINE		Electronique	LEBERRE	Zoologie (Orsay)
SILBER	T	Chimie (P.C.B.)	SCHAEFFER	Microbiologie (Orsay)
UEBERSFELD ...	T	Electronique	DE GENNES	Phys. des solides (Orsay)
YVON	T	Théories physiques	RIOU	Phys. nuclé. exp. (Orsay)
HERVÉ	T	Mathématiques	CLAUSER	Chimie biol. (Orsay)
NÉRON	T	Mathé. (M.P.C., Orsay)	CHEVALIER	Physiol. animale (Orsay)
Mme PECKER			JANCOVICI	Physique atom. (Orsay)
WIMEL	T	Astrophysique	FALK-VAIRANT ..	Physique nucl. (Orsay)
BALKANSKY		Physique (M.P.C.)	FETIZON	Chimie propé. (Orsay)
LE CORRE	T	Electricité	CERF	Mathématiques (Orsay)
DELICROIX	T	Physique théor. (Orsay)	LURCAT	Physique
GOURDIN		Physique théor. des hautes énergies (Orsay)	RIGAUDY	Chimie (S.P.C.N.)
LEHMANN	T	Phys. expér. des hautes énergies	SIGWALT	Chimie (S.P.C.N.)
NATAF	T	Physique nucl. et Radio activité (Orsay)	FOURNET	Electricité générale
ECHALIER		Biologie animale (P.C.B.)	COLLONGUES ...	Chimie (C.P.E.N.)
BARRAUD		Physiologie cellulaire	DUBERT	Biochimie
LIORÉ		Physiologie végé. (Orsay)	LAVOREL	Biologie physico-chimique
DARS		Géologie structurale et géologie appliquée	MOREL (F.)	Physiologie comparée
			TALBOT	Génétique chimique
			Mme NOUGARÈDE	Botanique
			FRANÇOIS	Zoologie
			IVANOFF	Océanographie physique
			CADIOT	Chimie organique
			BARUCH	Physique propédeutique
			NOZIÈRES	Physique générale
			BOK	Physique propédeutique
			SLONIMSKI	Génétique

INTRODUCTION

La présence dans certains organes végétaux de substances capables de produire une mousse persistante comparable à celle du savon (sapo) est connue depuis toute antiquité. Cette propriété fut largement utilisée pour le lavage sans qu'on songeât pour autant à isoler les principes immédiats qui en étaient responsables.

KOFLER (1927) fait partir l'histoire des saponines de GMELIN qui créa le mot « saponin » en 1819. Toujours selon le même, TROMSDORFF (1832) aurait eu le premier entre les mains une saponine pure, tandis que les auteurs français s'accordent pour attribuer à BUSSY (1833) la priorité en la matière.

On peut actuellement définir les saponines comme des hétérosides dont l'aglucone n'est pas azoté (encore qu'il y ait des exceptions comme la solanine qui fait transition avec les alcaloïdes) et dont les solutions aqueuses ont la propriété commune de donner des mousses persistantes et très rigides. Ajoutons que la plupart sont douées de propriétés hémolysantes très accentuées, qu'elles doivent selon toute vraisemblance à une affinité marquée pour le cholestérol.

Ces dérivés ont fait l'objet, au cours du XIX^e siècle et de la première moitié du XX^e, de travaux chimiques et pharmacologiques d'un développement considérable, de telle sorte qu'il nous est impossible d'envisager d'en établir la bibliographie complète et que nous renvoyons le lecteur aux grandes monographies et revues d'ensemble, sur le sujet (KOBERT, 1904, 1916, 1917; KOFLER, 1927; SANNIE, 1948). Nous ne ferons état, dans le développement de chaque chapitre, que des mémoires en relation directe avec le présent travail.

Il faut remonter de moins d'un siècle pour atteindre la période « héroïque » de la pharmacologie. Malgré MAGENDIE et Claude BERNARD, on s'en tenait souvent à l'observation des faits expérimentaux sans pouvoir en tirer de conclusion bien probante.

Les saponines (ou plutôt la saponine, car on crut longtemps à un seul principe immédiat, support des propriétés définies plus haut)

étaient alors en vedette. On s'étonnait de la grande toxicité de certaines plantes à saponine pour les animaux aquatiques, et les expérimentateurs injectant des décoctés concentrés de ces plantes aux animaux de laboratoire, en tirèrent de curieuses conclusions. C'est ainsi que PELIKAN (1867) nota, après l'injection, la contracture du muscle de Grenouille et son absence de réponse à la stimulation.

Il conclut (un peu hâtivement) à une activité anesthésique locale, et KÖHLER (1873) développa avec bonheur ses conclusions dans un mémoire¹.

Quelques années plus tard, KEPPLER voulant examiner de plus près les propriétés anesthésiques de la saponine, s'en injecta une dose notable sous la peau de la cuisse (1 ml à 10 %). L'expérience faillit lui coûter la vie et provoqua d'autre part une douleur très vive au point d'injection. Son rapport particulièrement autorisé (1878) mit fin définitivement à la carrière anesthésique des saponines.

On n'en continua pas moins à préconiser les plantes à saponine au titre de thérapeutiques diverses, mais la voie parentérale fut définitivement proscrite (pour les emplois thérapeutiques, voir KOFLER (1927), chapitre 44).

On s'aperçut d'ailleurs bien vite que ces substances possédaient une telle ubiquité de fixation qu'il n'y avait pas lieu d'espérer sur l'animal entier la moindre spécificité.

Dès lors, si l'on voulait pouvoir tirer de l'expérimentation des conclusions valables, il devenait impératif de réserver les saponines les plus actives aux études sur les organes isolés qu'il est possible de maintenir en survie en l'absence d'hématies. Encore ne faut-il pas attacher trop d'importance aux chiffres, car il faut compter sur la tensioactivité qui interdit toute précision aux dilutions un peu élevées en milieu aqueux.

En dehors des techniques sur les organes isolés, il a cependant été possible de mettre en évidence une grande facilitation de la résorption intestinale de substances diverses sous l'effet des saponines. Bien entendu, les propriétés hémolytiques ont été l'objet d'investigations multiples et poussées.

Notre étude a négligé ces voies largement ouvertes par des chercheurs nombreux et qualifiés. Il nous est apparu opportun de donner

(1) PELIKAN, qui était un médecin russe connu, avait été très impressionné par les expériences de Claude BERNARD sur le curare. Il essaya un peu tout suivant le même protocole. Il semble, à la lecture de son texte, qu'ayant constaté que la saponine, contrairement au curare, détruisait l'excitabilité directe du muscle, il se soit cru autorisé de ce fait à conclure à un effet anesthésique local. Il donna d'ailleurs à son travail une grande publicité dans plusieurs pays européens (nous ne citons que la référence française), preuve de l'importance qu'il lui attachait.

à notre travail, bien qu'il ne concernât qu'une seule saponine, celle de Quillaya, un point de vue physiologique plus général et de faire porter notre effort sur l'étude des mécanismes d'action.

Divers auteurs avant nous ont envisagé la pharmacodynamie des saponines comme un problème d'ensemble et certains ont apporté une contribution expérimentale appréciable (VILLEDIEU, 1939), d'autres ont appuyé leurs conclusions sur des résultats physico-chimiques (LENDLE, 1951 ; GESSNER, 1943), ce qui nous semble une exception très louable, car d'ordinaire les études physicochimiques d'une part et pharmacodynamiques d'autre part ne présentent aucun lien tangible. S'il peut paraître maintenant puéril de vouloir à toute force réduire les phénomènes physiologiques à ceux des sciences physico-chimiques susceptibles d'une expression mathématique, il est bien évident que, sans nourrir pour autant des espoirs trop hâtifs comme au début du siècle et sans négliger le côté qualitatif non mesurable des phénomènes vitaux, nous devons considérer de nos jours aussi bien qu'hier cette préoccupation comme le but à atteindre sous peine de démission.

Dans une première partie physicochimique, nous examinons les conditions d'interaction entre saponine, cholestérol et protéines. Nous sommes amené à comparer aux propriétés de la saponine de Quillaya, objet principal de notre étude, celle d'une autre saponine tirée du *Sapindus mukorossi* (Gaert).

Dans le chapitre réservé au comportement de la saponine de Quillaya vis-à-vis du cholestérol, nous étudions d'abord la fixation de la saponine sur les cristaux de cholestérol en milieu aqueux, puis l'action de la saponine sur les micelles mixtes lécithine-cholestérol, ce qui nous rapproche déjà davantage des conditions biologiques. Enfin, les cénapses lipido-protéidiques du sérum sanguin nous fournissent un matériel biochimique permettant de mettre en évidence les différences d'activité lipido-libératrices des saponines de Quillaya et de *Sapindus*.

Ceci nous amène à examiner les interactions saponines-protides. Utilisant successivement des techniques de mesure de tension superficielle, d'essorage de mousses, d'électrophorèse, nous mettons en évidence l'absence de liaison stable entre protides et saponines, et nous rapportons l'inhibition de l'activité de ces dernières en milieu protéique à un phénomène de « barrage » superficiel d'origine purement physicochimique.

La partie pharmacodynamique comprend d'abord l'étude de l'action de la saponine de Quillaya sur les *structures endothélioïdes* ; à commencer par l'épinèvre que nous voyons rendue plus perméable aux ions calcium sous l'effet de la saponine et de diverses autres

substances mouillantes ; elle a ensuite pour objet les *vaisseaux capillaires* du mésentère et du poumon. Sur ces derniers, la saponine provoque une transsudation plasmatiche réalisant un œdème pulmonaire expérimental. Nous localisons le lieu de passage des liquides extravasés aux sutures endothéliales et nous discutons du rôle du ciment intercellulaire dans les processus de perméabilité.

L'action de la saponine de Quillaya sur les *fibres musculaires* striées, sur les fibres lisses et sur le myocarde est ensuite envisagée. Sur les premières, cette action a essentiellement pour résultat une contracture. Nous prouvons que cette contracture résulte bien d'une modification de la membrane des fibres et non d'un raccourcissement direct des structures contractiles. Nous comparons cette contracture à celle que provoquent certains inhibiteurs métaboliques et nous discutons en particulier de sa parenté avec l'« effet Lundsgaard ». Nous examinons pour terminer le rôle éventuel des échanges ioniques.

Dans tous les cas, les propriétés physicochimiques nous sont apparues comme déterminantes au détriment d'une quelconque spécificité moléculaire, car des saponines de configuration différente et même des mouillants synthétiques ont parfois fait montre de la même activité physiologique.

Les saponines ont déçu les espoirs thérapeutiques fondés bien à l'aventurée sur les conclusions trop hâtives d'un examen superficiel de leurs propriétés physiologiques. Il semble que leur action, typiquement non spécifique, ne laisse aucun doute sur l'inaptitude foncière de la plupart d'entre elles (et notamment de celle de Quillaya) à l'emploi comme médicament.

Elles n'en restent pas moins aux mains des physiologistes et des pharmacologistes des réactifs intéressants capables d'apporter une aide efficace à la solution de certains problèmes tant morphologiques que fonctionnels posés par les structures vivantes.

* *

Avant d'aborder l'exposé de notre travail, qu'il nous soit permis d'exprimer notre affectueuse gratitude à Monsieur le Professeur G. VALETTE qui, après nous avoir accepté comme élève en nous proposant le sujet des présentes recherches, n'a cessé de nous guider avec autorité et sollicitude, nous marquant de surcroît sa particulière confiance en nous choisissant pour occuper auprès de lui les fonctions d'assistant.

Nos remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur A.-M. MONNIER, pour nous avoir accueilli dans son laboratoire afin de nous initier aux techniques électrophysiologiques et pour avoir manifesté

un intérêt constant à nos travaux, alors même qu'une mission d'enseignement à l'Institut Rockefeller l'empêcha de présider notre jury de thèse.

Il appartient à Messieurs les Professeurs A. SOULAIRAC, H. LENORMANT et M. JULIA de juger notre travail dans des circonstances difficiles ; il convient ici de leur témoigner notre reconnaissance pour la bienveillance de leur accueil et l'aimable autorité de leurs critiques.

Monsieur le Professeur A. QUEVAUVILLER, qui a guidé nos premiers pas sur la voie de la pharmacodynamie expérimentale, nous a toujours manifesté une estime qui nous est précieuse et qui doit plus à l'amitié qu'à nos mérites ; qu'il reçoive ici l'assurance de notre respectueux attachement. Les mêmes sentiments nous animent à l'égard de Monsieur le Professeur R. CAVIER qui nous a initié aux délicates techniques de mesure de la tension superficielle et nous a accueilli au cours de deux années dans son laboratoire hospitalier pour les mettre en œuvre sous sa direction. Nous avons toujours apprécié les conseils avisés et les encouragements amicaux de Mademoiselle H. MORIN, Chef de Travaux de Pharmacodynamie ; nous lui exprimons notre dévouement reconnaissant.

Nous avons encore bénéficié de l'aide bienveillante de Messieurs P. GRABAR et P. MANIGALT, Chefs de Service à l'Institut Pasteur, respectivement pour la mise à notre disposition du matériel nécessaire à la préparation du sérum délipidé et pour l'apprentissage de la photomicrographie ; nous les assurons de notre déférente gratitude.

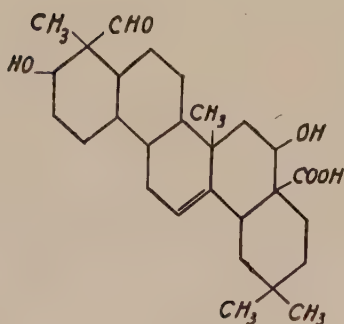
Nous remercions enfin Messieurs les Professeurs F. TAYEAU et P. BALANSARD qui se sont intéressés à nos recherches et nous ont aimablement fourni la saponine de Sapindus, et Monsieur P. BOQUET, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui a mis à notre disposition les venins de serpents.

Que nos Collègues et Amis de la Faculté de Pharmacie et de la Faculté des Sciences, notamment A. HUIDOBRO, Y. COHEN, S. GARCET, J. ANGLADE, J. SAVEL, P. LAGET, E. CORABŒUF, R. SAUMONT, R. GAILLARD, trouvent ici le témoignage de nos sentiments bien cordiaux.

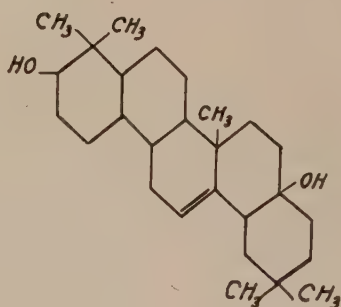
NOTE SUR LES SUBSTANCES UTILISEES

— *Saponines* : les saponines de Quillaya (*Quillaja saponaria* (Mol.) Rosacées) et de Sapindus (*Sapindus mukorossi* (Gaert.) Sapindacées) sont des hétérosides, c'est-à-dire que leur molécule comporte à côté d'un certain nombre de restes glucidiques une partie non sucrée (aglucone ou génine). Cette génine appartient pour les deux saponines envisagées au groupe triterpénique (voir les formules ci-dessous), alors que d'autres saponines comme le digitonoside possèdent au contraire une génine stéroïdique. La masse moléculaire de ces saponines triterpéniques est mal connue car elles sont très difficiles à purifier; nous avons été amené de ce fait à exprimer les concentrations en poids par unité de volume et non pas en molarité. La taille de la micelle de saponine de saponaire a été évaluée à 8,3 angströms de rayon moyen par VERSTRAETE et GRASSMAN (1943) par des mesures de constante de diffusion. Cette saponine étant très voisine de celles que nous avons étudiées, il est vraisemblable que leur rayon moléculaire est de même ordre.

(Notre échantillon de saponine de Quillaya provient des Ets MAY et BAKER, Dagenham, Essex, Royaume-Uni. La saponine de Sapindus nous a été fournie par MM. les Professeurs TAYEAU et BALANSARD, que nous remercions vivement.)



Acide quillayique
(génine de la saponine
de Quillaya)



Hédéragénine
(génine de la saponine
de *Sapindus mukorossi*)

Sucres :

Glucose
Galactose (contesté)
Acide uronique ?

Sucres :

Arabinose
d-fructose
Rhamnose

Références : JERMSTAD et WAALER (1953); WINTERSTEIN et BLAU (1911); WINTERSTEIN et MAXIM (1919); KITASATO et SONE (1932); RUZICKA, JAEGER, REDEL et VOLLI (1945).

- Ricinoléate de sodium
- Dibromoricinoléate de sodium
- Cholate de sodium
- Taurocholate de sodium
- Acide agaricique (cétylcitrique) : extrait par nous-mêmes de *Agaricus officinalis*.
- Digitonoside : provenance U.C.L.A.F.
- Lysocithine : préparation par nos soins selon LEVÈNE, ROLF et SIMMS (1924).
- Sapamine MS (méthylsulfate de diéthylaminoéthyl-oléylamide asymétrique) : Ciba, 58, avenue Hoche, Paris.
- Hyamine 1622 (chlorure d'isobutyl-phénoxy-éthoxy-éthyl-diméthylammonium) : Rohm et Haas, Philadelphie.
- Invadine BL (dibutyl-naphtalène sulfonate de sodium) : Ciba.
- Tibalène AN (sel de sodium de l'ester-butylicricinoléique sulfoné) : Kuhlmann, 11, rue de la Baume, Paris.
- Sodoline OS (ester butylique de l'acide oléique sulfoné) : Barnier, 3, rue Pasteur, Valence (Drôme).
- Cétavlon (bromure de cétyl-triméthylammonium) : Laboratoire Avlon, à Enghien (Seine-et-Oise).

PARTIE PHYSICO-CHIMIQUE

ACTION DE LA SAPONINE DE QUILLAYA SUR LE CHOLESTEROL (Comparaison avec d'autres réactifs voisins)

Travaux antérieurs

Les travaux antérieurs sont peu nombreux. En effet, bien que l'existence d'une combinaison entre la saponine de Quillaya et le cholestérol eût été soupçonnée depuis longtemps et qu'on expliquât ainsi l'activité hémolytique de cette saponine, une telle combinaison n'avait jamais été prouvée de façon directe, ainsi que l'avait fait WINDAUS (1909) pour le digitonosite et le cholestérol.

Cependant, KOFLER, FISHER et NEWSELY (1929) ont pu mettre en évidence l'affinité de la saponine du Quillaya pour le cholestérol par « analyse capillaire ».

Ils opèrent de la façon suivante :

Sur des bandes de papier filtre larges de 1 cm environ, on dépose au tiers de la longueur une goutte à 1 % de cholestérol dans l'alcool à 96°C. Après séchage, on obtient ainsi une zone imprégnée de cholestérol qui occupe sur une dizaine de millimètres toute la largeur de la bande.

Si l'on plonge l'extrémité de la bande la plus proche de la zone imprégnée de cholestérol dans une solution aqueuse diluée de saponine du Quillaya, l'ascension capillaire permettra aux deux substances d'entrer en contact. Au bout d'un certain temps, un lavage à l'eau va éliminer la saponine qui n'est pas fixée au cholestérol.

Si l'on détruit alors la combinaison saponine-cholestérol par le toluène à l'ébullition, le cholestérol passe en solution dans ce solvant, tandis que la saponine qui y est rigoureusement insoluble, reste adsorbée sur les fibres du papier.

KOFLER « révèle » alors la saponine par de la gélose au sang. Notons que cette technique a été étendue par KOFLER, FISCHER et NEWSELY (1929) à d'autres saponines et que ces auteurs l'ont érigée en méthode générale de détection spécifique des saponines dans les substances végétales alimentaires ou médicamenteuses.

De ce travail, on peut conclure nettement à une affinité entre la saponine de Quillaya et le cholestérol ; mais il convient de noter que la combinaison, si tant est qu'elle existe en proportions stoechiométriques, n'a pas été isolée, faute probablement d'un solvant commun aux deux réactifs. Elle est de toute évidence insoluble dans l'eau.

Des deux substances, c'est la saponine qui est l'élément hydro-trope, cette hydrotropie n'est toutefois que relative.

Travaux personnels

Nos travaux personnels essaient de préciser ces notions.

1) Action sur les cristaux de cholestérol

a) Le cholestérol cristallise de l'alcool à 95°GL bouillant en tablettes rhombiques avec une molécule d'eau de cristallisation qu'il perd à 110°. Les cristaux possèdent souvent des angles rentrants assez caractéristiques.

L'éther abandonne des aiguilles soyeuses. Il est très soluble dans l'éther, un peu moins dans le chloroforme et notablement dans le benzène, le sulfure de carbone et les carbures aliphatiques. Il est peu soluble à froid dans l'alcool à 96°GL (1,28 % seulement à 20°).

b) L'action de la saponine du Quillaya sur la structure microscopique des cristaux de cholestérol est strictement nulle. On n'obtient pas de dissociation des cristaux, pas la moindre figure de myéline, pas de modification de la biréfringence. À titre de comparaison, nous avons étudié l'action de quelques substances tensioactives beaucoup plus hydrotropes constituées par des mouillants industriels (utilisés pour le lavage des laines ou pour faire pénétrer les bains de teinture) et qui conduisent à un passage plus ou moins rapide du cholestérol en phase aqueuse.

Les plus puissants (Sodoline O.S. p. ex.) donnent une dissolution presque immédiate (moins de 10 secondes) sans grand phénomène visible.

Le cristal s'éclaircit de plus en plus et, après s'être entouré d'une auréole biréfringente, se fond dans le milieu extérieur.

Des mouillants un peu moins rapides (Tibalène) donnent lieu à un grignotage marginal suivi de passage en phase liquide. Enfin, avec certains produits comme la Sapamine M.S., on obtient rapidement des excroissances digitées ou arrondies rappelant les figures de myéline et qui sont très attrayantes. Ces structures sont biréfringentes et on admet qu'elles sont constituées par un empilement de feuillet doubles cholestérol-mouillant. Peu à peu, les digitations s'allongent et se dispersent dans le milieu aqueux en micelles mixtes qui ne sont que des débris submicroscopiques des feuillet doubles ci-dessus (DERVICHIAN, 1946).

Du fait même des structures décrites, la quantité de cholestérol « dissous » est proportionnelle à la quantité de mouillant.

Avec l'Invadine BL, par exemple, nos chiffres sont les suivants :

INVADINE (en g/cm ³)	CHOLESTEROL (en mg/10 ml)	RAPPORT Chol/Inv.
0,02	0,1	5
0,06	0,3	5
0,20	0,8	4
0,6	3,3	5,5
2	12	6

Si nous nous étendons quelque peu sur l'action des mouillants synthétiques sur les cristaux de cholestérol, c'est que nous avons pu, dans l'étude physiologique ultérieure, comparer dans certains cas leur action à celle de la saponine.

c) MODIFICATION DE LA SOLUBILITÉ DU CHOLESTÉROL DANS L'ÉTHÉR DE PÉTROLE : nous avons vu que, lorsqu'on traite par une solution aqueuse de saponine des cristaux de cholestérol, on n'observe pas de passage de ceux-ci en phase aqueuse. Par contre, il est légitime de supposer que, puisqu'il y a liaison, ainsi que l'ont montré KOFLER et NEWELESY, une couche au moins monomoléculaire de saponine doit venir tapisser la surface des cristaux et apporter, du seul fait de sa présence, des perturbations dans la solubilité normale du cholestérol dans les solvants des lipides.

C'est bien ce que l'on observe si l'on cherche, par tâtonnement, la quantité d'éther de pétrole la plus petite pour dissoudre un même poids de cholestérol traité ou non par la saponine de Quillaya. Le cholestérol « saponiné » se dissout beaucoup plus difficilement. Cepen-

dant, si l'on met en présence d'une quantité fixe d'éther de pétrole un excès de cholestérol, saponiné ou non (excès connu et constant) et que l'on soumet l'ensemble à une agitation suffisante, il se dissout la même quantité de cholestérol dans les deux cas. La combinaison de la saponine de Quillaya avec le cholestérol est donc bien plus labile que celle du digitonoside qui n'est dissociée que par le xylène bouillant.

Nous suivons le protocole ci-dessous : on prépare d'abord le cholestérol « saponiné » en mettant en suspension 1 g de cholestérol dans 10 ml de solution aqueuse de saponine contenant 100 mg de cette dernière. On laisse en contact pendant 3 heures en remettant en suspension toutes les 30 minutes. Le culot de cholestérol est alors lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation. On sèche à l'étuve à 55°C. La solubilité est alors déterminée sur 100 mg de cholestérol (« saponiné » ou non) mis en contact avec 2 ml d'éther de pétrole pendant une demi-heure avec remise en suspension toutes les 5 minutes du cholestérol sédimenté. On pèse ensuite l'extrait sec de 1 cm de solution centrifugée. Dans ces conditions, la saponine fixée sur le cholestérol est libérée et forme un fin précipité dans l'éther de pétrole.

Nos chiffres sont les suivants :

Poids de CHOLESTEROL "saponiné" dissous dans 1 ml d'éther de pétrole			Poids de CHOLESTEROL normal dissous dans 1 ml d'éther de pétrole		
N° 1	67 mg	moyenne 64,5 mg	N° 7	61 mg	moyenne 63,6 mg
N° 2	63 mg		N° 8	66 mg	
N° 3	61 mg		N° 9	62 mg	
N° 4	67 mg		N° 10	70 mg	
N° 5	68 mg		N° 11	61 mg	
N° 6	61 mg		N° 12	62 mg	

On voit que, par cette méthode, il n'y a manifestement pas de variation de solubilité du cholestérol dans l'éther de pétrole par traitement avec une solution aqueuse de saponine de Quillaya. Il n'en reste pas moins qu'il y a une affinité notable de ces deux espèces chimiques, car trois lavages à l'eau par remise en suspension et centrifugation n'éliminent pas la saponine fixée sur les cristaux de cholestérol, c'est-à-dire dans de mauvaises conditions de fixation, le support étant somme toute assez peu divisé. La fixation est d'ailleurs peu solide, puisque l'agitation modérée suffit à éliminer la saponine en milieu éthéropétrolique.

2) Action de la saponine de Quillaya sur les micelles mixtes lécithine-cholestérol

En 1921, HATTORI a montré qu'il était possible de réaliser des suspensions aqueuses de cholestérol relativement stables en lui associant de la lécithine.

Il est nécessaire que la lécithine soit en léger excès par rapport au cholestérol (3 parties pour 2 au moins).

VALETTE et CAVIER (1938) ont employé de telles suspensions de micelles mixtes pour étudier l'action des savons et du digitonoside sur le cholestérol. Ils ont pu montrer que les savons éclaircissaient les suspensions, les rendant optiquement vides par formation de micelles triples suffisamment hydrotropes. La quantité de savon nécessaire varie avec la proportion lécithine/cholestérol et avec la nature du savon, de telle sorte qu'on peut pour chacun de ceux-ci tracer une courbe de la quantité versée en fonction du rapport de proportion ci-dessus.

Par contre, le digitonoside précipite les suspensions mixtes alors qu'il n'a aucun effet sur la lécithine seule. Il y a là un phénomène d'entraînement.

Nous avons suivi la technique de préparation des suspensions mixtes telle qu'elle a été décrite par CAVIER (1943).

Nos résultats sont les suivants :

a) Les mouillants synthétiques utilisés par ailleurs (Sapamine MS, Cétavlon, Hyamine 1622, Tibalène, Invadine BL) sont doués d'un pouvoir éclaircissant élevé. Nous ne donnons pas les chiffres, car il ne nous a pas été possible de savoir quelle était la teneur exacte des préparations commerciales utilisées en chacun des principes actifs.

Il semble cependant que, par ordre d'activité croissante, on ait :
Cétavlon < Sapamine MS < Hyamine 1622 < Tibalène < Invadine BL

b) Ajoutée à une série de suspensions lécithine-cholestérol, la saponine de Quillaya provoque un léger éclaircissement, mais les liquides restent encore très louches quelle que soit la dose ajoutée.

On n'obtient pas non plus de précipité comparable à celui qu'observent VALETTE et CAVIER (1938) dans le cas du digitonoside (essais à pH 6,6, 7,2 et 8).

Il apparaît donc que la saponine de Quillaya possède assez de propriétés hydrotropes pour maintenir les micelles mixtes en suspension, mais pas assez pour rendre la suspension optiquement vide.

3) Action sur le cholestérol à l'état de cénapses lipido-protidiques

On sait que le cholestérol plasmatique se trouve engagé dans des associations moléculaires complexes dont l'existence explique que le cholestérol, bien qu'insoluble dans l'eau, puisse exister dans le plasma sanguin, milieu essentiellement aqueux dans un état qui peut être qualifié de « dissous ». On sait également que l'éther, excellent solvant des lipides et du cholestérol, n'extraît pratiquement rien lorsqu'on l'agite avec du plasma sanguin. C'est HOPE-SEYLER qui, en 1870, l'a écrit le premier avant bien d'autres, tandis que SÖRENSEN (1930) montrait que les lipides devenaient extractibles par l'éther après action de l'alcool. MACHEBŒUF (1928) isola pour la première fois des complexes lipoprotéidiques bien définis et créa le terme de cénapses. Depuis lors, bien des schémas ont été proposés pour décrire des associations lipoprotéidiques rendant compte de leurs principales propriétés. Leur énumération, même limitée aux mieux établies et aux plus récentes, sortirait de notre propos (voir le rapport de TAYEAU, 1957). D'autre part, TAYEAU a montré, en 1941, que certains saponosides possèdent la propriété, en présence d'éther, de « décoller » quantitativement et électivement le cholestérol du sérum sanguin.

Retenons donc, en résumé, les points suivants :

- 1° L'éther agité avec du sérum ou du plasma n'extraît pas de cholestérol.
- 2° La saponine de *Sapindus* permet à l'éther d'extraire pratiquement tout le cholestérol du sérum ; la saponine de *Quillaya* n'a pas cette propriété.

Nos recherches ont porté sur les points suivants :

a) EXTRACTIBILITÉ DU CHOLESTÉROL LIBÉRÉ PAR LA SAPONINE DE *SAPINDUS* :

Nous nous sommes demandé si l'éther (oxyde d'éthyle) n'intervenait pas secondairement sur l'extractibilité du cholestérol en présence de saponine de *Sapindus*.

Nous avons constaté qu'après traitement du sérum par la saponine, l'éther de pétrole restait incapable d'extraire la moindre quantité de cholestérol. Ce fait est facilement interprétable à la lumière de nos expériences précédentes sur les cristaux de cholestérol : le cholestérol libéré des cénapses va se trouver en présence d'un excès de saponine qui, grâce à son affinité pour le cholestérol « naissant » très divisé, empêche sa dissolution dans l'éther de pétrole. Au contraire, si l'on « décolle » le cholestérol par l'alcool sodé selon GRIGAUT (1910), l'éther de pétrole peut extraire la majeure partie du cholestérol.

Une quantité minime d'éther suffit d'ailleurs à dissocier le complexe et à rendre le cholestérol extractible, preuve que l'association cholestérol-saponine (ici de *Sapindus*) n'est pas bien solide, contrairement aux micelles mixtes du cholestérol avec les détergents auxquels nous avons fait allusion plus haut, d'où le cholestérol ne peut être extrait que par un traitement énergique à l'alcool sodé (voir p. 13 nos résultats personnels avec l'Invadine).

b) ETUDE DU POURCENTAGE DE CHOLESTÉROL EXTRACTIBLE
(TAUX D'EXTRACTION) EN FONCTION DE LA DOSE DE SAPONINE AJOUTÉE :

TAYEAU (1944) a montré qu'il y avait une quantité optimale de saponine de *Sapindus* permettant la libération de cholestérol avec une marge assez étroite de part et d'autre de cette quantité. Nous avons étudié systématiquement l'influence de la quantité de saponine utilisée sur le taux d'extraction du cholestérol. Deux saponines ont été comparées, qui se placent aux extrémités opposées du pouvoir « décollant » vis-à-vis du cholestérol des cénapses :

- la saponine de *Quillaya* qui fait l'objet principal de notre travail ;
- la saponine de *Sapindus mukorossi*, connue pour très active sur le phénomène envisagé.

Technique utilisée : la saponine étudiée est introduite en quantité voulue dans une ampoule à décantation de 60 ml dont on utilise une série de huit, chacune contenant une dose de saponine, l'ensemble de celles-ci formant une progression géométrique approximativement de raison 2 :

0 (témoin) ; 2 mg ; 5 mg ; 10 mg ; 20 mg ; 50 mg ; 100 mg ; 200 mg ; 400 mg

On ajoute alors 2 ml de sérum de cheval au contenu de chaque ampoule. Pour avoir des résultats comparables, nous avons préparé un lot unique de sérum provenant de la coagulation de 3 litres de sang du même cheval et prélevés par saignée jugulaire lors de l'abattage.

— Bien qu'il soit connu que l'extractibilité du cholestérol varie quelque peu au cours du vieillissement du sérum (TAYEAU, 1944), cette façon de procéder nous a paru préférable à l'emploi de sérums d'animaux différents.

Après l'addition de sérum, la saponine est dissoute dans celui-ci en agitant avec précaution pour éviter autant que possible la formation de mousse. Après un repos de 30 minutes, on ajoute 15 ml d'éther, on met en contact les deux phases par retournement et rotation de l'ampoule, toujours en évitant les mouvements brusques qui donneraient naissance à une émulsion stable. (Il suffirait d'ajouter quel-

ques ml d'alcool pour rompre l'émulsion, mais la nature de l'expérience nous interdit évidemment de procéder ainsi, car nous « décollerions » tout le cholestérol.)

On laisse reposer cinq heures pour obtenir une bonne séparation. Au bout de ce temps, la phase aqueuse est soutirée, on ajoute alors 10 ml d'éther de pétrole pour relarguer l'eau, on laisse reposer une demi-heure, puis le liquide éthéré est décanté et évaporé.

L'extrait lipidique est repris par 5 ml de chloroforme sur lesquels on pratique la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD (1885) comme décrit par GRIGAUT (1910).

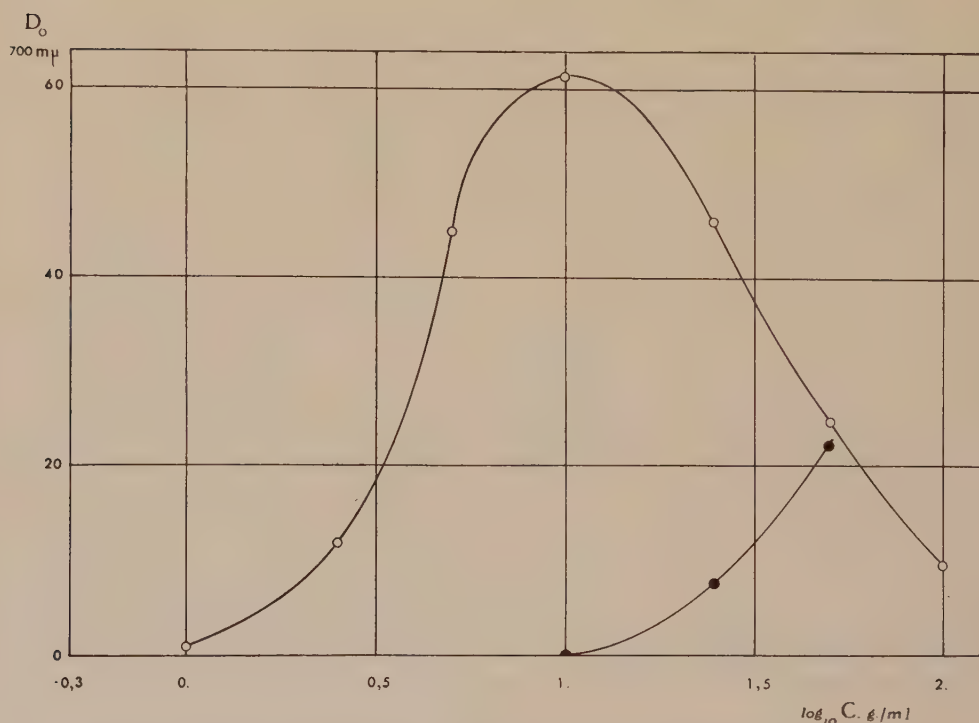


FIG. 1 : Quantité de cholestérol extraite du sérum en fonction du logarithme, de la concentration en saponine de Quillaya ●—● et de Sapindus ○—○

La quantité de cholestérol est exprimée en densité optique à 700 mμ après réaction de LIEBERMANN

La lecture est effectuée au bout de 30 minutes de maintien à l'obscurité à l'aide du photomètre de BONET-MAURY à réseau sous une épaisseur de 1 cm et pour une longueur d'onde de 700 mμ.

Les résultats sont rassemblés dans la *figure 1* (densité optique en fonction du logarithme décimal de la concentration en grammes par litre).

On voit que pour la saponine de *Sapindus*, le taux d'extraction, d'abord croissant en fonction de la concentration, passe par un maximum puis décroît.

On a une courbe qui rappelle d'assez près une courbe binomiale et qui semble traduire de ce fait l'action simultanée mais non superposable de deux facteurs antagonistes.

Une telle courbe évoque, dans le même ordre d'idées, celle qu'a calculée (et aussi retrouvée expérimentalement ARIENS (1954) pour les cas d'autocompétition).

Dès lors, une hypothèse semble logique : c'est que la saponine de *Quillaya*, qui se montre globalement inactive sur le « décollement » du cholestérol des cénapses, doive cette activité à une prédominance du facteur secondaire recomplexant.

La courbe de la *figure 1* montre bien qu'il n'en est pas ainsi et que c'est bien l'activité « décomplexante » primaire qui est faible, car on n'obtient jamais pour les concentrations les plus fortes qu'une courbe ascendante sans maximum.

Il est donc permis de supposer que s'il était possible de pousser l'expérience plus loin dans le domaine des fortes concentrations en Q-saponine (ce que la limite de solubilité interdit), on obtiendrait de la même façon une courbe présentant un maximum.

c) ETUDE DU TAUX D'EXTRACTION DU CHOLESTÉROL PAR L'ÉTHÉR APRÈS ACTION D'UN MÉLANGE DE SAPONINE DE QUILLAYA ET DE SAPONINE DE SAPINDUS :

Le phénomène décrit ci-dessus peut être qualifié d'autocompétition par analogie formelle avec le phénomène ainsi qualifié en pharmacodynamie, bien qu'en l'occurrence la diminution secondaire d'extrac-tibilité soit due à un phénomène physicochimique totalement différent, semble-t-il, de celui impliqué dans le « décollement » ; c'est du moins ce que suggèrent nos expériences sur la diminution de la solubilité du cholestérol dans l'éther de pétrole sous l'influence des saponines.

Il est cependant possible d'envisager aussi, comme en pharmacodynamie, une compétition « vraie », c'est-à-dire un remplacement total ou partiel d'une substance active sur un récepteur déterminé par une substance inactive (ou seulement moins active) sur cet récepteur et qui possède cependant pour ce dernier une affinité notable.

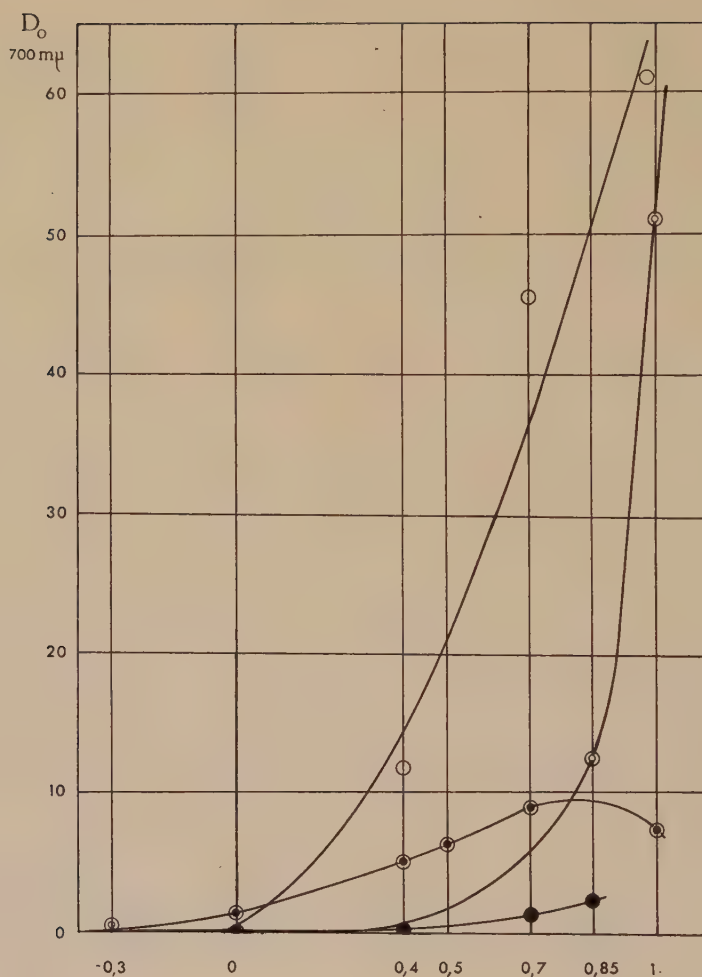


FIG. 2 : Quantité de cholestérol libérée du sérum en fonction du logarithme, de la concentration en saponine de *Sapindus* et en présence de quantités variables de Saponine de *Quillaya*

(○ = saponine de *Sapindus* seule ; ◐ = 5 mg ; ◑ = 10 mg ; ● = 20 mg)

La quantité de cholestérol est exprimée en densité optique à 700 mμ après réaction de LIEBERMANN

Nous avons donc étudié l'effet sur le taux d'extraction du cholestérol par l'éther, de mélanges en proportions variables de saponine de *Sapindus* et de saponine de *Quillaya*.

Nous avons utilisé les mêmes doses successivement croissantes de saponine de Sapindus que dans la série d'expériences précédentes en ne dépassant pas toutefois la dose qui donne le taux d'extractibilité maximal (20 mg) pour ne pas compliquer l'interprétation, car au-delà de ce maximum, un troisième facteur serait à prendre en considération ; c'est à savoir l'action « autocompétitrice » de la saponine de Sapindus.

Les courbes de la *figure 2* montrent que l'expérience confirme bien notre hypothèse et que les courbes, toujours en dessous de celles qui concerne la saponine de Sapindus seule, montrent une pente d'autant plus faible que la saponine de Quillaya est plus abondante.

Il est donc possible de conclure que les saponines de Quillaya et de Sapindus ont une affinité du même ordre de grandeur pour un « récepteur » commun au niveau des lipoprotéines sériques, mais que seule la molécule de saponine de Sapindus, en vertu de propriétés stériques particulières, est capable d'effectuer le « décollement » du cholestérol des cénapses.

RECHERCHES PHYSICO-CHIMIQUES SUR L'INTERACTION EN MILIEU AQUEUX DES SAPONINES ET DES COLLOIDES PLASMATIQUES OU DE LEURS SUBSTITUTS

L'activité physiologique des saponines a été depuis longtemps rapportée à leurs propriétés tensioactives et ensuite à leur capacité de combinaison avec les stérols, et c'est surtout dans ce sens qu'ont été dirigées les investigations physicochimiques.

Mais l'action des saponines sur les protéines n'en a pas été pour autant négligée et l'on a peine à croire qu'un tel sujet, qui pour le non-initié peut paraître d'un intérêt assez secondaire, ait donné lieu à autant de controverses souvent passionnées.

Nous avons déjà, dans l'introduction, posé le problème de l'administration des substances tensioactives et en particulier des saponines. Pour beaucoup de composés médicamenteux, la combinaison avec les protéines plasmatiques joue un rôle vecteur prépondérant, surtout si ces composés sont peu solubles dans l'eau (purgatifs anthraquinoniques par exemple). Pour d'autres dérivés, il semble qu'au contraire la combinaison avec les protéines plasmatiques ait pour effet d'empêcher l'action physiologique (sels biliaires dans le sang).

Enfin, l'étude des capacités de liaison d'une espèce chimique avec les protéines peut aider à la compréhension de son action physiologique, pour autant que celle-ci consiste en une action sur les protéines constituant la matière vivante.

Travaux antérieurs concernant la liaison entre les saponines et les protides

RANSOM (1901) remarque que l'hémolyse par la saponine est inhibée par le sérum et par le cholestérol. Après extraction à l'éther, le sérum perd sa propriété inhibitrice. Ces résultats furent confirmés par ceux de PORT (1910) et de JAHNSON-BLOHM (1913) sur le digitonoside.

Nous savons aujourd'hui que le digitonoside et le cholestérol forment une association moléculaire dans le rapport 1/1 (WINDAUS, 1909) et que cette association est dépourvue de pouvoir hémolytique (KOFER et RAUM, 1930).

Puis une observation de RAMSDEN (1904) montre que les solutions de protides ne sont pas influencées par la saponine et que celle-ci peut en être extraite de nouveau.

De même, EISLER (1906), KURT MEYER (1908), EHRENTIEL et WEIS-OSTBORN (1923), PERETZ (1929) et NAGEL (1938) ont effectué des expériences de nature diverse concluant à l'absence de liaisons entre saponines et protides.

Cependant JARISCH (1922) faisant agir une solution de saponine sur du sérum dialysé, a observé un volumineux précipité dont il a étudié la solubilité en fonction de la concentration en chlorure de sodium. Il conclut que le précipité est constitué par des protéines. Un peu plus tard, HARRINGTON et SCOTT (1929) montrent que l'insuline brute peut être débarrassée de toutes ses impuretés protidiques au moyen de saponine de *Gypsophylla*. Celle-ci précipite les protides à l'exclusion de l'insuline qui reste en solution. Cependant le pH, de précipitabilité maximale de l'insuline ainsi traitée (qui coïncide d'ordinaire avec le point isoélectrique), de 5,6, se voit déplacé vers des valeurs beaucoup plus acides. Il y aurait donc une combinaison de l'insuline avec la saponine non suivie de précipitation, mais ceci ne retient pas l'attention des expérimentateurs que seul semble intéresser le phénomène directement visible de la floculation, et c'est sur ce dernier point que l'un d'eux va poursuivre des recherches. A cet effet, SCOTT et GLAISTER (1929) s'adressent à un sérum antidiphtérique qu'ils additionnent de saponine en solution aqueuse et à des pH variés. Ils constatent que le maximum de précipitation des protéines a lieu à $\text{pH} = 4$. Les sels neutres redissolvent le précipité et inhibent sa formation. Le précipité présente un rapport constant saponine/protéine égal sensiblement à 1,26.

Notons d'ailleurs que toutes les protéines ne peuvent être précipitées, même par un excès de saponine. Les auteurs interprètent ce

fait comme le résultat de l'action dissolvante vis-à-vis du précipité des petites quantités de sels présentes dans le sérum antitoxique. Enfin l'antitoxine précipitée perd au moins 10 % de son activité. SCOTT et GLAISTER concluent que la liaison entre saponine et protides sériques est d'un type « lâche », mais présente cependant des caractères de réaction stoechiométrique dans certaines limites de pH.

Plus récemment, BALANSARD et BERNARD (1947) ont montré qu'un mélange de solutions de saponine de *Sapindus* et de sérumalbumine ne floccule pas, mais que par traitement par le sulfate d'ammonium on précipite un floculat complexe, d'où la saponine est récupérable par extraction à l'acétone.

D'autre part, RUYSEN et VERSTRAETE (1937), à qui l'on doit d'importants travaux sur la structure des sols de saponines, ont étudié les conditions dans lesquelles apparaissent des coacervats complexes par mélanges de sols de saponine et de gélatine. Ces auteurs étudient la viscosité des mélanges en fonction de la concentration relative en chacun des constituants et à différents pH. La coacervation, rappelons-le, représente une séparation en deux phases inégalement solvatées et non miscibles ; à savoir des gouttelettes de coacervat très concentré et un « liquide d'équilibre » plus dilué formant la phase dispersante. La phase dispersée (coacervat) étant formée de particules relativement grosses, n'intervient pas dans la viscosité qui reflète ainsi la concentration du liquide d'équilibre dispersant. La coacervation appauvrissant la phase liquide en protéines au profit du coacervat, provoque donc une diminution de la viscosité. Ce phénomène se manifeste entre le pH isoélectrique de la gélatine (4,7) et le pH = 2,5 au-dessous duquel les micelles de saponine sont pratiquement déchargées. Il résulte de ces mesures que les coacervats gélatine-saponine, tant par leurs propriétés que par leurs conditions de formation, rentrent bien dans le cadre de la définition des coacervats complexes donnée par BUNGENBERG DE JONG (1936). Ces coacervats résultent d'une désolvation partielle ne laissant subsister que la couche solvatante proximale orientée ; et cette désolvation est ici la conséquence de la neutralisation des charges opposées des deux colloïdes. Il va sans dire que la gélatine est un protéide assez spécial, et que la plupart des protides peuvent dans ces conditions donner lieu à la formation de floculats d'allure solide. La nature solide ou liquide et l'existence même de la phase désolvatée dépendent largement des conditions expérimentales, en particulier de la température et du pH, ainsi que l'ont démontré DERVICHIAN et MAGNANT (1947).

Une confirmation indirecte en fut donnée par TAYEAU (1941) qui, étudiant le déplacement des lipides des cénapses par les détergents, a été amené à considérer que les saponinés, au moins celles à noyau

stérolique, déplaçaient le cholestérol des cénapses cholestéro-protéiques par suite d'une action compétitive vis-à-vis des protides, les molécules de saponoside prenant la place de celles de cholestérol au sein de nouveaux complexes analogues aux cénapses détruites.

Il y aurait donc un mode de liaison entre les saponines et les protides autre que le type polaire ; et ce type correspondrait peut-être à celui qu'ont déjà envisagé MACHEBŒUF et SANDOR (1932) pour les cénapses lipidoprotidiques et que DERVICHIAN (1946) a généralisé.

D'un point de vue quelque peu différent, les travaux de SCHULMAN et RIDEAL (1937), qui ont trait aux phénomènes superficiels, vont apporter des résultats importants. Ces auteurs, reprenant une méthode de mesure des potentiels électriques créés par l'étalement à la surface de l'eau de couches monomoléculaires établie par le physicien français GUYOT en 1924, ont pu montrer que si une solution de saponine est injectée sous un film superficiel de gliadine, il y a un rapide changement dans le potentiel électrique de la surface (« phase boundary potential ») qui passe de 330 mV à 260 mV, mais seulement un faible et lent changement de la pression de surface. Il n'y aurait donc pas pénétration de la couche de protéine par la saponine ; celle-ci viendrait seulement former en dessous une couche d'adsorption. SCHULMAN et RIDEAL soulignent la différence avec la pénétration d'une monocouche de cholestérol par le digitonoside où l'on observe précisément les phénomènes inverses.

Tous les auteurs que nous venons de citer, ou bien ne constatent pas de liaison saponine-protides, ou bien font allusion à des phénomènes coacervatifs qui ne peuvent avoir lieu dans les conditions biologiques de pH.

Cependant PONDER (1923), confirmé par KENNEDY (1926), a contesté que seul le cholestérol entre en jeu dans l'action inhibitrice du sérum vis-à-vis de l'hémolyse par les saponines. Selon lui, l'hémolyse par la saponine est empêchée en grande partie par les protéines du sérum, puis pour une faible partie par le cholestérol et pas du tout par les lécithines. PONDER admet une association labile de nature adsorptive entre saponines et protides.

L'action inhibitrice du sérum n'est pas constante. Le sérum d'animaux variés et aussi celui de différents individus, selon différentes circonstances physiologiques et pathologiques, montrent une activité inhibitrice de valeur variable (KOFER, 1927) (voir aussi FABRE et SIMONNET, 1926, et VALETTE, 1944).

Cette question complexe n'a été abordée que par SCHMIDT-THOME (1942). D'après ses résultats, l'action empêchante du sérum sur l'hémolyse par la digitonine se rapporte exactement à sa teneur en cholestérol non estérifié.

Travaux personnels

1) Recherches utilisant des mesures de tension superficielle

Notre étude a porté sur deux saponines triterpéniques, la saponine du *Quillaya* et celle du *Sapindus mukorossi* (Gertn.). Leurs génines sont très voisines, mais ces saponines se situent aux extrémités opposées dans les classifications :

- a) Selon l'aptitude à précipiter par les métaux lourds (KOBERT, 1887).
- b) Selon l'aptitude à libérer le cholestérol des cénapses (TAYEAU, 1950).

Nous avons déterminé, en fonction de la concentration, la tension superficielle des solutions de saponines dans l'eau distillée seule, dans l'eau distillée additionnée de sérum normal, de sérum délipidé ou encore de polyvinylpyrrolidone.

Nous avons pu montrer ainsi qu'il y avait interaction entre les deux sortes de colloïdes et, nous plaçant ensuite dans des conditions de pH qui excluent les possibilités de liaisons polaires, nous avons pu montrer que l'interaction subsiste, mais qu'il n'y avait pas à proprement parler d'union en phase massive.

Notre interprétation des phénomènes est que la grande difficulté qu'éprouvent les saponines à pénétrer les films superficiels de protéines de structure gélatineuse les retient sous ces derniers, empêchant la manifestation superficielle de l'équilibre de GIBBS. Nous en discuterons plus loin en détail.

TECHNIQUE

Nous croyons devoir insister sur les précautions toutes particulières qui doivent être prises lors des expériences portant sur la tension superficielle et tout particulièrement dans le cas des couches d'étalement ou d'adsorption.

D'autres l'ont fait avant nous et avec plus d'autorité ; mais au terme d'une expérience de plusieurs années en ce domaine, nous avons pensé qu'il pourrait être utile à d'autres chercheurs d'avoir l'exposé *in extenso* de notre technique.

Les tensions superficielles ont été mesurées à l'aide du tensiomètre d'ABRIBAT et DOGNON (1939 et 1941) à lame de platine en position de contact à une température comprise entre 17 et 22 degrés. Le volume et la surface libre des solutions en expérience étaient

constants et respectivement de 10 ml et de 12,6 cm² dans toutes les mesures. Les solutions de saponine les plus diluées étaient réalisées par répartition de dilutions alcooliques dans les récipients de mesure, évaporation du solvant à l'étuve jusqu'à élimination complète (10 minutes dans une étuve à 85°) et reprise par la quantité d'eau nécessaire. La répartition directe de solutions aqueuses de saponine ne nous a donné que de mauvais résultats par suite de la concentration superficielle qui provoque un appauvrissement relatif de la solution sous-jacente, phénomène très marqué par les grandes dilutions.

Nous utilisons de l'eau distillée dont la tension superficielle correspond à la valeur théorique. L'expérience nous a montré que le meilleur mode de conservation consistait en l'emploi du barillet couvert, d'usage général dans les laboratoires, que l'on doit remplir et laisser reposer au moins 24 heures avant l'utilisation. Le robinet ne doit jamais être ouvert en grand pour éviter les tourbillons. Dans ces conditions, on obtient une eau de tension superficielle tout à fait conforme aux chiffres théoriques, car les impuretés tensioactives (poussières, conidies de champignons) se rassemblent à la surface ; les autres impuretés, s'il y en a, tombent en général au fond. Lorsque la surface de l'eau dans le barillet arrive à 10 cm au-dessus du robinet, il faut rejeter l'eau résiduelle ; rincer le récipient soigneusement, le remplir et laisser au repos pendant 24 heures au moins. Nous n'avons obtenu que de piètres résultats avec une eau conservée dans un flacon sans tubulure inférieure, fût-elle bidistillée avec le plus grand soin, car dans ces conditions les souillures par les poussières sont inévitables au cours des manipulations.

Toute la verrerie est conservée 24 heures dans le mélange sulfochromique concentré (bichromate de potassium à saturation dans l'acide sulfurique concentré $d = 1,83$), elle est ensuite lavée abondamment à l'eau distillée. Les récipients de mesure (petits cristallisoirs cylindriques en Pyrex) ne sont jamais manipulés avec les doigts, mais seulement à l'aide d'une pince de nickel préalablement portée au rouge et refroidie.

En effet, nous avons constaté que si l'expérimentateur venait à toucher avec les doigts même l'extérieur des récipients, des traces de sécrétion sébacée étaient déposées sur le verre et, lors du chauffage à 85°C, elles se répandaient sur toute la surface et s'étalant ensuite sur l'eau lors de la mesure, faussaient les résultats.

Les cristallisoirs de mesure sortis du mélange sulfochromique (à l'aide d'un agitateur coudé qui y était au préalable à demi-immergé) sont rincés soigneusement cinq fois à l'eau distillée. Les pipettes traitées par le même réactif sont rincées dans une capsule elle-même traitée au mélange sulfochromique. On ne touche des pipettes que l'extrémité supérieure, le reste ne devant entrer en contact qu'avec

des surfaces dégraissées ou des corps poreux propres (papier filtre neuf pris à l'intérieur de la rame). Notons, à ce propos, la précieuse propriété que possède le papier filtre de garder adsorbées les traces de lipides qui ont pu l'atteindre et de ne pas les céder, même à chaud. Les récipients de mesure sont ensuite posés sur une plaque de verre recouverte d'un papier filtre que l'on renouvelle à chaque expérience. Ils sont d'abord posés renversés pour l'égouttage, puis retournés à l'aide de la pince, recouverts d'une seconde feuille de papier filtre maintenue par un agitateur et le tout est porté à l'étuve à 85°C jusqu'à siccité.

On retire alors l'ensemble, laisse refroidir à l'abri des courants d'air, puis la solution alcoolique de saponine est répartie rapidement, ainsi que la saponine ajoutée directement pour réaliser les fortes concentrations ; on porte 10 minutes à 85°C et laisse refroidir à l'abri des courants d'air comme précédemment. A partir de ce moment, on peut manipuler l'extérieur des récipients à la main. On ajoute l'eau et on agite doucement en donnant un mouvement tournant au cristalliseur (surtout ne pas faire mousser). On ne peut pas non plus agiter avec un agitateur même dégraissé, car cet objet emporterait à sa surface une partie de la saponine. Lorsqu'on opère en présence de protides ou de polyvinylpyrrolidone, ces produits sont déposés dans les cristalliseurs à l'état solide avant la répartition de l'eau.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé des solutions-tampon et des solutions salines très concentrées. Ces liquides sont préparés plusieurs jours à l'avance et laissés au repos dans une grande ampoule à décantation pour être soutirés doucement avant usage.

Nous avons vérifié que les quantités d'alcool mises en œuvre pour dissoudre la saponine et qui sont toujours très petites (de 0,03 à 0,3 ml), ne laissent aucun résidu fixe tensioactif. On aurait pu craindre aussi que les saponines ne retinssent des traces d'alcool lors de la dessiccation, mais la nature du solvant, fortement aqueux (alcool à 40°GL), et le fait que les saponines étudiées ont bien plus d'affinité pour l'eau que pour l'alcool dans lequel elles sont moins solubles¹. Les solutions les plus diluées de saponine ont d'ailleurs même tension superficielle que l'eau.

Nous avons utilisé les dilutions de saponine suivantes :

10^{-7} ; 10^{-6} ; $3 \cdot 10^{-6}$; 10^{-5} ; $3 \cdot 10^{-5}$; 10^{-4} ; $3 \cdot 10^{-4}$; 10^{-3} ; $3 \cdot 10^{-3}$; 10^{-2}

(1) La saponine du *Quillaya* est pratiquement insoluble dans l'alcool absolu ; en solution dans un alcool de titre inférieur (de 30°GL à 60°GL), elle se dissout très facilement en donnant des solutions dépourvues de propriétés aphrogènes ; mais il n'est pas certain que dans ces solutions elle soit dispersée à l'état moléculaire.

Les quantités correspondantes de saponine sont dissoutes dans 10 ml d'eau distillée si l'on opère sur la saponine seule ou 5 ml si on doit ultérieurement ajouter une autre solution. Dans ce dernier cas, on verse dans la solution de saponine préparée dans chaque récipient, une quantité de 5 ml, soit d'une dilution de sérum normal ou de sérum délipidé ou encore de protides sériques isolés (sérum-albumine ou sérum-globuline préparées selon MACHEBŒUF (1947)), de telle sorte que la teneur finale en protides soit de 3 pour 100. Les solutions de protides qui vont être ajoutées aux solutions de saponine sont préparées dans des fioles jaugées traitées au mélange chromique ; leur forte concentration en protéines permet de les répartir à la pipette sans trop d'erreur, car la phase massive est homogène, la phase superficielle étant largement saturée.

L'addition de solutions protéiques à une solution de saponine de Quillaya provoque la formation d'un précipité plus ou moins abondant selon la concentration en saponine ; on n'observe pas un tel précipité avec la saponine de Sapindus.

Le sérum dit « normal » était du sérum de bœuf provenant de la coagulation spontanée de sang fraîchement recueilli et centrifugé pour éliminer les hématies qui ont pu échapper à la rétraction du caillot (ce qui est fréquent avec le sang de bœuf).

Le sérum délipidé était préparé à partir des mêmes échantillons de sérum de bœuf par la méthode de HARDY et GARDINER (1910), modifiée par HEWITT (1927), c'est à savoir par précipitation par l'alcool-éther à basse température (au-dessous de -5°C).

La polyvinylpyrrolidone (P.V.P.) est ajoutée à la dose de 5 ml d'une solution à 2,5 pour 100 obtenue par dilution au $1/10^{\text{e}}$ de la solution commerciale à 25 pour 100 ; de telle sorte qu'on obtienne une solution à 1,25 pour 100 possédant à peu près la même pression oncotique que les solutions protéiques ci-dessus.

Les solutions, une fois préparées et rendues homogènes par rotation dans un plan comme ci-dessus décrit, sont laissées au repos 4 heures durant, de manière à obtenir un état de surface stable. Certains auteurs recommandent d'attendre 24 heures ou même 48 heures avant d'effectuer les mesures (BLANQUET et TAYEAU, 1947), mais, par notre propre expérience, nous n'avons pas obtenu de grandes différences entre les mesures effectuées au bout de 24 heures et celles où il n'a été attendu que 4 heures. Dans le cas qui nous occupe, les causes d'erreur qui peuvent résulter d'une attente prolongée (poussières, pullulation microbienne, dessiccation) nous ont semblé l'emporter en fin de compte sur un gain en précision hasardeux. Nous n'avons donc attendu que 4 heures. Au bout de ce temps, en immergeant avec précaution la lame de platine du tensiomètre, le film superficiel vient mouiller les deux faces de la lame sans se briser aucu-

nement et, au bout de 10 minutes, les valeurs de la tension superficielle qui décroissent très légèrement au début sont parfaitement stabilisées. Il faut veiller, particulièrement lorsqu'on mesure les tensions de surface en présence de films superficiels, à ce que la lame soit réellement en position de contact, c'est-à-dire que sa limite inférieure soit exactement dans le plan superficiel lorsqu'on a obtenu l'équilibre de l'index de la balance électromagnétique.

En effet, les films superficiels (surtout ceux de protides qui sont de véritables gels) sont doués d'élasticité et adhèrent à la lame de mesure pour leur propre compte, de telle sorte que lorsque la force qui équilibre la tension superficielle a été dépassée, on n'a pas une rupture brusque du contact comme avec un liquide pur. Les auteurs de la méthode ont d'ailleurs signalé ce fait que nous avons, pour notre part, maintes fois eu l'occasion d'observer.

RÉSULTATS

Les courbes des *figures 3 et 4* schématisent les résultats.

Dans l'établissement des graphiques, nous avons porté en ordonnées la tension superficielle en dynes par centimètre, et en abscisses le logarithme népérien de la concentration en saponine en grammes par litre de phase massive.

D'après cette notation, la pente de la tangente à la courbe en un point donné représente, à un facteur constant près, l'« excès relatif » de concentration à la surface par unité de surface.

En effet, l'équation « isotherme » de GIBBS (1876) qui traduit à partir de considérations thermodynamiques le rapport entre les concentrations de la phase superficielle et celles de la phase massive, nous donne :

$$\sigma = \frac{RT}{1} \left(\frac{d \gamma}{d \log C} \right)$$

où :

- σ est l'excès de concentration à la surface en grammes par centimètre carré ;
- γ = tension superficielle ;
- C = concentration en grammes par litre de la phase massive ;
- R = constante des gaz parfaits ;
- T = température absolue.

On voit, à l'examen des courbes, que les saponines obéissent assez bien à l'équation de GIBBS, car la partie médiane de la courbe $\gamma = f(\log. c)$ est constituée par une droite. Dans le cas des mesures de tension superficielle en présence de sérum normal ou délipidé (courbes des *figures 3 et 4*), les parties incurvées correspondent à

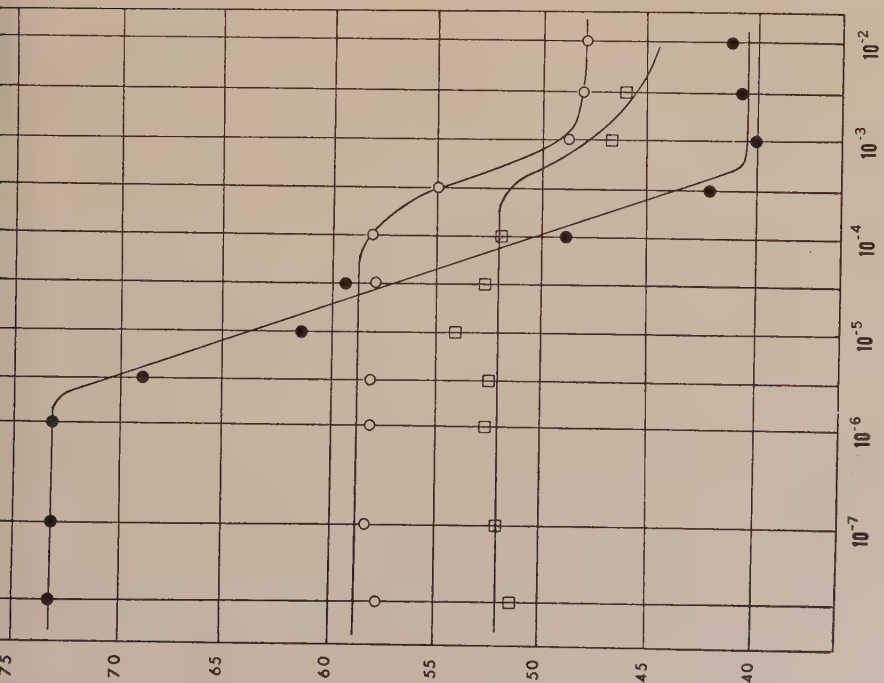


FIG. 3 : Tension superficielle en dynes/cm en fonction de la concentration en saponine de Quillaya (log₁₀ de la concentration en g/l)

● : Saponine dans l'eau distillée ; ○ : dans le sérum normal ; □ : dans le sérum délipidé

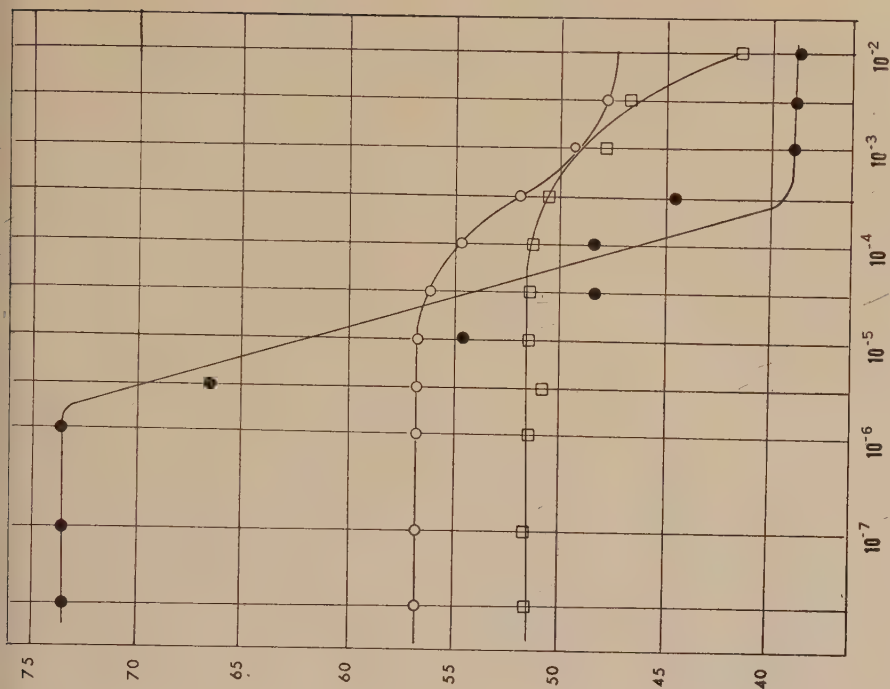


FIG. 4 : Tension superficielle en dynes/cm en fonction de la concentration en saponine de Sapindus (log₁₀ de la concentration en g/l)

● : Saponine dans l'eau distillée ; ○ : dans le sérum normal ; □ : dans le sérum délipidé

un retard de concentration superficielle en saponine par rapport au segment droit qui représente les tensions superficielles de la saponine seule aux mêmes concentrations dans la phase massive ; tout se passe comme si le sérum retenait la saponine à l'intérieur de la solution aqueuse. Le phénomène se produit d'une manière similaire en présence de sérum normal et de sérum délipidé, ce qui montre bien que les lipides n'interviennent que d'une manière discrète. Le décalage entre les courbes ○ et □ peut difficilement être interprété uniquement comme un effet de l'élimination des lipides. Nous savons, en effet, que la délipidation, même réalisée dans les meilleures conditions, n'est pas sans bouleverser l'architecture des protides sériques (ARDRY, 1950 et 1951).

La *figure 5*, qui correspond à la polyvinylpyrrolidone, illustre le phénomène inverse : on observe un excès de concentration à la surface (pente de la tangente à la courbe) déjà important pour de très faibles concentrations en saponine dans la phase massive. Tout se passe comme si la présence de P.V.P., colloïde très hydrophile, aidait la saponine à chasser l'eau de la surface en retenant ce solvant dans la phase massive, tandis que la saponine, pour laquelle la P.V.P. ne montre aucune affinité, irait occuper la surface ; ou encore, comme s'il y avait une sorte de relargage de la saponine par un effet analogue au « salting out ».

Cet effet répulsif vis-à-vis de la saponine est de moins en moins apparent à mesure que la concentration de cette dernière croît dans la solution et la partie terminale de la courbe ★ rejoint celle de la courbe ● pour laquelle la surface est saturée.

La *figure 3* se rapporte à la saponine du Quillaya ; avec celle du Sapindus, on obtient des courbes tout à fait comparables (*fig. 4*), bien qu'il n'y ait jamais séparation d'un floculat comme dans le cas de la saponine du Quillaya. On ne peut donc admettre que les variations de la tension superficielle observée dans les *courbes 3* et *4* soient la conséquence de la floculation et n'affectent que le liquide d'équilibre du floculat.

Pour compléter, nous avons effectué une série de mesures de tension superficielle des deux saponines en fonction de leur concentration et à trois pH différents (4,6, 6,8, 8,6) et en présence soit de sérum-albumine, soit de sérum-globuline. Les courbes obtenues sont très semblables à celles des *figures 3* et *4*.

On voit que l'interaction entre les saponines et les différents protides expérimentés est pratiquement du même ordre aux différents pH.

Pour étudier les possibilités d'action de relargage de la saponine par la P.V.P., nous avons effectué des mesures sur des séries de

dilutions de saponine, non plus dans l'eau, mais dans les solutions concentrées de sulfate d'ammonium, sel qui est susceptible, à concentration suffisante, de relarguer les saponines.

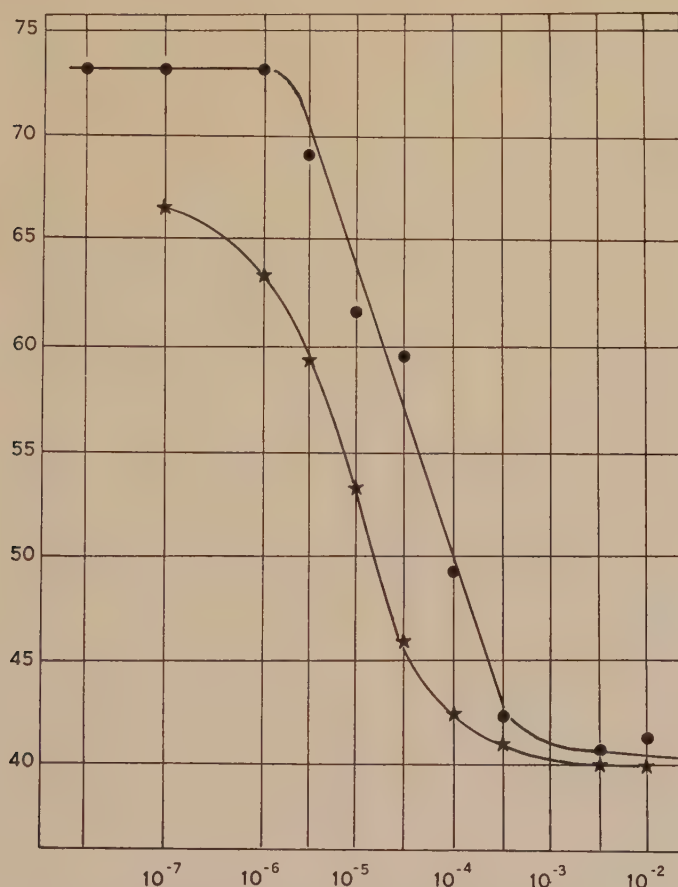


FIG. 5 : Tension superficielle en dynes/cm en fonction de la concentration en saponine de Quillaja ($\log_{10}$ de la concentration en g/l)

● : Saponine dans l'eau distillée ;
 ★ : dans une solution à 1,25 % de Polyvinylpyrrolidone

Malheureusement, malgré toutes nos précautions, il n'est pas facile d'obtenir des valeurs constantes de la tension superficielle pour une solution de sulfate d'ammonium saturée. Il y a d'une part la présence inévitable d'impuretés provenant du sel, et d'autre part il n'est pas évident que la méthode d'ABRIBAT et DOGNON soit applicable dans

cette circonstance, car elle suppose que l'angle de raccordement de la surface avec la lame de platine qui sert à la mesure soit nul (mouillage parfait). Or, tel ne semble pas être le cas pour les solutions concentrées de sels. Quoi qu'il en soit, en répétant les mesures de tension superficielle sur une même solution et en nettoyant chaque fois la lame entre deux mesures par lavage et chauffage au rouge, on arrive à une sorte de balayage de la surface. Dans ces conditions, la valeur de la tension de surface croît de façon continue : nous avons obtenu jusqu'à 85 dynes/cm en partant d'une valeur inférieure à celle de l'eau (75 dynes/cm). Le même inconvénient existe déjà avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Les dilutions de saponine de Quillaya effectuées dans le sulfate d'ammonium saturé présentent des tensions superficielles qui suivent très sensiblement la courbe obtenue dans l'eau jusqu'à la concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ pour laquelle il commence à se manifester une floculation visible à l'œil nu, accompagnée d'un palier de tension superficielle remontant quelque peu pour les fortes concentrations. Toutefois, nous précisons que sur ce dernier point nous ne pouvons tenir nos chiffres pour parfaitement assurés pour les raisons énoncées plus haut.

On peut donc apporter comme conclusion à cette série d'expériences, que l'« activité de surface » nécessite une certaine proportion entre les propriétés lyophiles et les propriétés lipophiles de la molécule. Si les propriétés de lyophilie viennent à être diminuées, la concentration superficielle augmente, l'activité de surface aussi ; et ceci jusqu'au moment où la lyophilie devient assez faible pour ne plus assurer l'orientation des molécules de la surface : il y a relargage total ; la concentration superficielle est maximale, tandis que l'activité de surface va baisser brusquement et pourra même devenir nulle.

2) Recherches utilisant les séparations par essorage de mousses

Lorsqu'un amas de mousse persistante est déposé sur une paroi lisse verticale, du liquide s'écoule de façon continue de la mousse, tandis que les bulles grandissent et que certaines éclatent ; de telle sorte qu'à la fin, on n'a plus que quelques grosses bulles présentant les irisations des lames minces. Ces bulles sont des interfaces doubles air-liquide-air contenant très peu de phase liquide massive si l'essorage est terminé ; elles représentent donc une très grande concentration de la substance aphrogène. ABRIBAT (1942) a utilisé ce phénomène d'essorage comme base d'une méthode de séparation des substances tensioactives : un courant d'air très divisé passant à travers une solution contenant un corps tensioactif y produit une mousse abondante que l'on fait monter dans un large tube de verre dépoli. Au fur et à mesure de l'ascension de la mousse, celle-ci s'essore et

les bulles éclatent, de telle sorte que pour une pression d'air déterminée, on peut obtenir un équilibre dynamique de la colonne mous-sante. On prélève alors différentes fractions. Nous ne pouvons expo-ser ici, bien entendu, le détail de la méthode.

Notre appareil était constitué de manchons de verre Pyrex de 60 millimètres de diamètre, dépolis par une suspension de FNa dans FH (car on peut difficilement sabler un tube de ce diamètre). Les manchons de verre étaient reliés par des tubes de caoutchouc de dia-mètre approprié. La hauteur de l'ensemble était de 1,40 m (nous avons utilisé au début des hauteurs beaucoup plus grandes, mais cette hau-teur d'essorage s'est montrée suffisante). L'injecteur d'air est formé par une bougie Chamberland n° 1, soumise à une pression d'air de 0,150 kg par cm², portée en fin d'expérience à 0,5 kg par cm².

ABRIBAT (1942) signale que par moussage d'un mélange de saponine et de gélatine, c'est toujours la saponine qui constitue les têtes ; car c'est celle-ci qui possède la plus grande « rigidité superficielle ». Nous avons retrouvé le même ordre par moussage de sols mixtes saponine-protéines sériques. La saponine est identifiée dans les diffé-rentes fractions de mousse recueillies en traitant celles-ci par l'alcool qui « abat » la mousse et précipite les protéines s'il en est de pré-sentes, tandis que la saponine passe en solution. L'alcool séparé est évaporé ; on reprend par du sérum physiologique et la saponine est recherchée par ses propriétés hémolysantes.

Nous avons pu, en opérant de la sorte, séparer d'abord la sapo-nine du Quillaya sans protides, puis les protides sans saponine.

On peut en conclure que :

- 1° S'il y a une combinaison saponine-protides en phase massive, elle est vraiment peu stable et ne résiste pas au moussage. (Tout au plus peut-on invoquer des forces de VAN DER WAALS.)
- 2° S'il y a formation de couches superficielles mixtes, celles-ci sont instables et moins rigides que les couches de saponine.

Notons enfin que nous avons soumis au moussage des solutions colloïdales utilisées comme substituts du plasma (sur la constatation que ces solutions possèdent une « pression oncotique » convenable); la P.V.P. plus haut citée et le Dextran (polysaccharide de haut poids moléculaire synthétisé par des microorganismes) ne nous ont pas per-mis d'obtenir par moussage leur séparation de la phase aqueuse, car ils ne donnaient pas de mousse persistante.

Nous pensons qu'une telle différence avec les protéines ne permet pas de considérer les solutions colloïdales de ces corps comme de bons substituts du plasma en physiologie, car nous avons des raisons de croire que les propriétés superficielles des protéines plasmatiques interviennent, à côté de la pression oncotique, pour régler les échanges d'eau entre le plasma et les liquides extra-vasculaires.

La critique est moins grave en ce qui concerne les emplois thérapeutiques, car de telles solutions ne constituent jamais dans ce cas l'intégralité du liquide intra-vasculaire, et elles sont toujours mélangées à une certaine quantité de sang qui rend le milieu suffisamment protéique pour que ses propriétés de surface n'en soient pas affectées.

3) Recherches utilisant l'électrophorèse différentielle

On sait que lorsque l'on soumet un sol de colloïde à un champ électrique continu, les particules selon leur charge se déplacent vers les électrodes avec une mobilité caractéristique.

Pour l'étude des protéines plasmatiques, on se place généralement dans les conditions de milieu (pH et force ionique) telles que les micelles soient négatives.

Dans ces conditions, par suite d'un courant de solvant en sens inverse de celui des particules et dû à l'électrosmose, il y a formation de frontières stables résultant de l'équilibre dynamique entre les deux phénomènes antagonistes.

Nous avons utilisé l'appareil JOUAN pour électrophorèse horizontale sur bandes de papier avec tampon au véronal de pH 8,8. L'électrophorèse a duré 8 heures sous une tension de 160 volts, correspondant à un champ électrique d'environ 5 volts/cm.

Ont été soumis parallèlement à l'électrophorèse :

- a) Une certaine quantité de saponine ($7,5 \text{ mm}^3$ d'une solution aqueuse à 5 mg par cm^3 , soit $37,5 \mu\text{g}$).
- b) Un mélange de la même quantité de saponine avec du sérum normal, du sérum délipidé ou encore un protide purifié ($7,5 \text{ mm}^3$ d'une solution contenant 5 mg de saponine par cm^3 de sérum ou par cm^3 d'une solution de même teneur en protides).

Les bandes, après un séchage rapide, ont été traitées :

- soit par la coloration habituelle permettant l'évaluation photométrique de chacune des fractions protéiques ;
- soit par coloration au Soudan IV pour la mise en évidence des lipoprotéines (lipidogramme) ;
- soit par la technique de « révélation » de la saponine imitée de KOFLER que nous avons mise au point à cet effet et qui est détaillée ci-après :

On prépare un gel de gélatine assez ferme, mais tel qu'il soit liquide autour de 40°C (10 % environ). On le fond au bain-marie puis, après refroidissement à 40°C , on lui incorpore rapidement par douce agitation un tiers de son volume d'hématies lavées 3 fois au sérum physiologique par centrifugation.

Cette « gélatine au sang » est ensuite coulée bien régulièrement sur une plaque de verre et refroidie. Les bandes d'électrophorèse sont appliqués sur la surface de la gélatine, puis recouvertes d'un papier filtre mouillé de sérum physiologique et, après élimination des bulles d'air, le tout est recouvert d'une plaque de verre épaisse.

Au bout de 30 minutes, on peut constater que partout où il y avait de la saponine, celle-ci a diffusé dans les couches supérieures de la gélatine, a hémolysé les hématies et, en retour, l'hémoglobine est venue tacher les parties de la bande qui se trouvent en regard.

Nous avons pu constater, comme l'avait déjà vu Loos (1953), que la saponine du *Quillaya* forme une seule bande assez diffuse, à telle enseigne qu'on obtient tous les intermédiaires entre une mobilité nulle et la mobilité maximale (front de la bande). Nous ne pensons pas qu'il faille incriminer la technique de révélation qui, si elle peut permettre une certaine diffusion latérale, ne saurait expliquer le défaut de séparation, d'autant que la frontière avant est assez nette et que, par ailleurs, Loos obtient des résultats encore moins nets par découpage et élution du papier. Il est vraisemblable que c'est l'adsorption de la saponine par le papier qui empêche une migration homogène. Il faudrait donc en conclure que les méthodes d'électrophorèse sur papier ne conviennent pas à l'étude des saponines.

Quoi qu'il en soit, les électrophorégrammes de sérum normal et de sérum délipidé, de sérum-albumine et de sérum-globuline isolées ne semblent pas affectés par la présence de saponine. Au pH où nous opérons (8,8), il ne peut y avoir d'union polaire de type coacervatif complexe ; il ne semble pas non plus qu'il existe d'autres liaisons. Notons toutefois que les résultats semblent un peu plus nets en ce qui concerne la saponine de *Sapindus* : on observe encore une bande très large, mais ses limites sont assez nettement délimitées.

Dans un mélange de saponine de *Sapindus* et de sérum, l'électrophorèse permet de retrouver la saponine au niveau des globulines, mais cette place correspond à la mobilité propre de la saponine ; aussi ne peut-on conclure à une liaison avec ces protides. En opérant à des pH plus acides, il serait possible de diminuer la mobilité des protéines, tandis que celle des saponines resterait pratiquement inchangée, mais on n'aurait pas de séparation des protéines en fractions nettes.

PARTIE PHARMACODYNAMIQUE

ACTION DE LA SAPONINE DE QUILLAYA SUR LES STRUCTURES ENDOTHELIOIDES

Travaux antérieurs

Nous entendons par structures endothélioïdes des membranes formées d'éléments cellulaires aplatis ; c'est-à-dire dont une dimension spatiale est d'un ordre de grandeur très inférieur à celui des deux autres.

Dans cette catégorie entrent les endothéliums vrais (endothéliums vasculaires, mésentère, mésos), mais aussi des formations tissulaires différentes, comme les gaines des nerfs et des tendons, toutes d'origine mésoblastique ; tandis que l'épithélium respiratoire, de structure en apparence très voisine, a une origine entoblastique.

Toutes ces membranes ont en commun, outre les caractères morphologiques constitués par la forme aplatie des cellules qui les composent et dont les lignes de suture sinueuses présentent un aspect typique, des propriétés fonctionnelles semblables :

- 1° En tant que membranes, elles peuvent jouer un rôle de séparation entre deux milieux qui diffèrent par leur composition chimique de façon qualitative ou seulement quantitative. Ce dernier cas toutefois est peu fréquent, car il revient au contraire typiquement aux structures de type épithélial de maintenir un gradient de part et d'autre de la barrières qu'elles constituent.
- 2° Ce rôle de séparation peut n'être toutefois que très imparfait et ne concerner dans certains cas que les grosses molécules protéiques, tandis que l'eau et les cristalloïdes traversent aisément (DANIELLI et STOCK, 1944) ou bien s'étendre à des molécules beaucoup plus petites et même aux ions dans le cas de l'épinèvre (FENG et LIU, 1949).

La perméabilité de ces formations est donc fort variable de l'une à l'autre. Beaucoup d'auteurs ont fait remarquer qu'il était nécessaire qu'un certain nombre de molécules protéiques puissent traverser les endothéliums vasculaires (MAN et PETERS, 1933 ; FISCHER, ASTRUP et VOLKERT, 1945) ¹.

Il y a lieu d'envisager deux possibilités dans la perméabilité de telles structures :

a) Le passage des substances à *travers la lame protoplasmique* que constituent les cellules. Ce processus est à prendre en considération, en particulier pour les gaz respiratoires dont la liposolubilité est notable et la molécule de petite dimension (HOLM-JENSEN, 1946).

b) Le passage des substances *entre les cellules* au niveau du ciment intercellulaire (STURM, 1947 ; CHAMBERS et ZWEIFACH, 1947).

Travaux personnels

Nos recherches montrent que c'est ce deuxième processus qui est particulièrement accéléré par la saponine, au moins dans le cas de l'endothélium capillaire, bien qu'il ne soit pas exclu que cette substance puisse également agir sur la perméabilité « transcellulaire » ².

I. — RECHERCHES UTILISANT L'ÉPINÈVRE

1) Recherches concernant la perméabilité de l'épinèvre aux ions calcium

Chez les Vertébrés, les nerfs rachidiens sont entourés d'une gaine d'origine conjonctive qui constitue un prolongement de la dure-mère.

(1) Il n'est pas interdit de penser que les liquides contenus à l'intérieur de l'épinèvre soient constitués par du liquide céphalo-rachidien. Ce liquide pourrait jouer un rôle vecteur, ainsi que le suggèrent des travaux qui ont pu mettre en évidence à l'intérieur de l'épinèvre par radiographie des gouttelettes opaques après injection intra-rachidienne d'huile bromée (SULLIVAN et MORTENSEN, 1934). C'est d'ailleurs l'avis de SCHEID (1941), tandis que WALLACE et BRODIE (1939) font remarquer que les liquides extra-cellulaires du système nerveux central ont une composition très voisine de celle du L.C.R. Il faut tenir compte cependant du rôle des lymphatiques (PONOMAREY, 1928 ; DEFRISE, 1930 ; MANTELL, 1932).

(2) Le transit des grosses molécules pourrait être dévolu à des ouvertures temporaires (STURM, 1947), stigmates ou stomates, créés temporairement par des processus particuliers (STARRY et TEKMAN, 1951).

D'abord formée de nombreuses couches de cellules aplaties qui lui donnent un aspect feuilleté, cette gaine se simplifie peu à peu au cours des divisions successives du nerf et à mesure qu'elle recouvre des rameaux nerveux plus ténus, si bien qu'aux ultimes terminaisons formées d'un seul axone (ou dendrite), elle se prolonge par la gaine de Henlé qui ne comporte plus qu'une seule couche de cellules très minces. Cette gaine a été nommée « épinèvre » par les anatomistes suédois KEY et RETZIUS (1876). Quelques années plus tard, RANVIER (1878) la nomme « gaine lamelleuse » et, critiquant le vocable « épinèvre », conteste l'antériorité des travaux suédois, citant notamment BICHAT (1812) et BOGROS (1827) ³.

Cette « gaine lamelleuse » a d'ailleurs fait l'objet, de la part de RANVIER, de deux leçons entières au Collège de France au début de janvier 1877. C'est dire l'importance qu'il attachait au sujet. A notre grand regret, nous emploierons cependant la notation « épinèvre » qui a prévalu sur celle du savant français.

Depuis, l'épinèvre semblait avoir perdu une grande partie de son intérêt ; on n'en trouvait trace que dans les traités d'histologie particulièrement complets. Aussi ne faut-il pas s'étonner outre mesure que les physiologistes n'en aient généralement tenu aucun compte, continuant à considérer purement et simplement un fragment de nerf périphérique comme la somme des axones qu'il contient.

A une époque beaucoup plus récente, FENG et GÉRARD (1930), puis FENG et LIU (1949), ont montré que l'élimination de l'épinèvre par dépouillement raccourcissait de façon considérable le temps néces-

(3) BOGROS, jeune médecin et anatomiste distingué, préparateur à la Faculté, passait pour ne pas donner à ses recherches toute la publicité qu'elles auraient méritée. Pourquoi fallut-il qu'à la fin de sa vie (il fût emporté très jeune par une phthisie), il crût tenir enfin une découverte sensationnelle : les nerfs étaient creux, à telle enseigne qu'on pouvait introduire dans leur intérieur des solutions colorées et même du mercure. Et BOGROS d'injecter tous les nerfs du règne animal pendant quatre années, au bout desquelles il prétendit que le système nerveux était constitué par des « vaisseaux d'un autre ordre ». Il rencontra, bien entendu, force oppositions et, ayant saisi enfin l'Académie des Sciences, celle-ci nomma une commission présidée par DUPUYTREN pour examiner ses expériences.

Sur ces entrefaites, il mourut, et DUPUYTREN ne voulut pas entacher sa mémoire par un rapport défavorable. La même année (1827), BRÉCHET et RASPAIL réussirent des coupes transversales de nerfs et décrivirent aux termes près les structures maintenant admises (Réf. même périodique, même tome).

C'était bien l'épinèvre que BOGROS injectait, créant par la pression la lumière centrale qu'il décrivait ensuite complaisamment comme préexistante.

La preuve en est qu'il lui fut impossible d'injecter de la même façon les racines rachidiennes :

« ... Les racines de tous les nerfs qui naissent de la moelle de l'épine et de ses prolongements cérébraux ne sont pas perméables à l'injection. Quelques précautions que j'aie prises, je n'ai jamais pu parvenir à les injecter. »

Or, on sait que ces structures, situées à l'intérieur des méninges, sont dépourvues de gaine conjonctive.

saire à l'obtention de l'inexcitabilité d'une préparation nerf-muscle de Grenouille plongée dans une solution de Ringer enrichie en calcium.

D'autres expérimentateurs, et en tout premier lieu LORENTE DE No (1950), prétendirent tout aussitôt que le dépouillement de l'épinèvre pouvait provoquer des lésions des axones, lésions responsables en grande partie de l'effet de raccourcissement du temps minimum de bloc de conduction par le calcium en excès observé par FENG et LIU.

Mais CRESCITELLI (1951) reprit alors la question et montra que si l'on privait un nerf de son épinèvre pour la remettre en place tout aussitôt avec les précautions requises, on retrouvait la relative imperméabilité aux ions calcium qui caractérise le nerf intact⁴. Les expériences que nous rapportons ci-après ont été effectuées en 1950 et 1951. Citons comme travaux ultérieurs : CORABŒUF et THIEULIN (1952), EMIROGLU (1955).

TECHNIQUE DE NOS ESSAIS SUR L'ÉPINÈVRE

Notre méthode a consisté à suivre comparativement les variations de la rhéobase et de la chronaxie de deux nerfs traités, l'un par une solution physiologique enrichie ou appauvrie en calcium, l'autre par la même solution additionnée de saponine de Quillaya.

Dans une autre série d'essais, nous comparons les deux sciatiques de la même grenouille attenants à leurs gastrocnémiens et plongés entre chaque mesure dans une solution de Ringer sans calcium après que l'un des deux sciatiques ait été au préalable privé de son épinèvre.

Les préparations étaient placées dans le montage chronaximétrique de LAPICQUE (1910) (méthode des condensateurs) modifié par RÉGNIER et QUEVAUVILLER (1938) de manière à pouvoir exprimer la rhéobase non pas en voltage, mais par l'intensité rhéobasique elle-même.

(4) Nous ne saurions cependant prétendre que l'enlèvement de l'épinèvre ne modifie absolument pas les caractéristiques électrophysiologiques de l'ensemble des fibres nerveuses qui y étaient contenues. En effet, dès qu'on dépouille l'épinèvre, les axones s'écartent très nettement les uns des autres, retenus seulement par de lâches travées conjonctives. Dans ces conditions, il y a forcément une grande diminution de l'influence mutuelle des circuits locaux des différentes fibres; ceux-ci étant déjà d'ailleurs modifiés par le contact d'un liquide « physiologique » dont l'équilibre ionique est prévu pour remplacer le plasma et non le liquide extra-cellulaire. Enfin, le volume extérieur offert aux courants de retour des circuits est devenu pratiquement infini, alors qu'à l'intérieur de l'épinèvre ce volume est très restreint. Le nerf « dégainé » se rapproche donc davantage d'une fibre isolée.

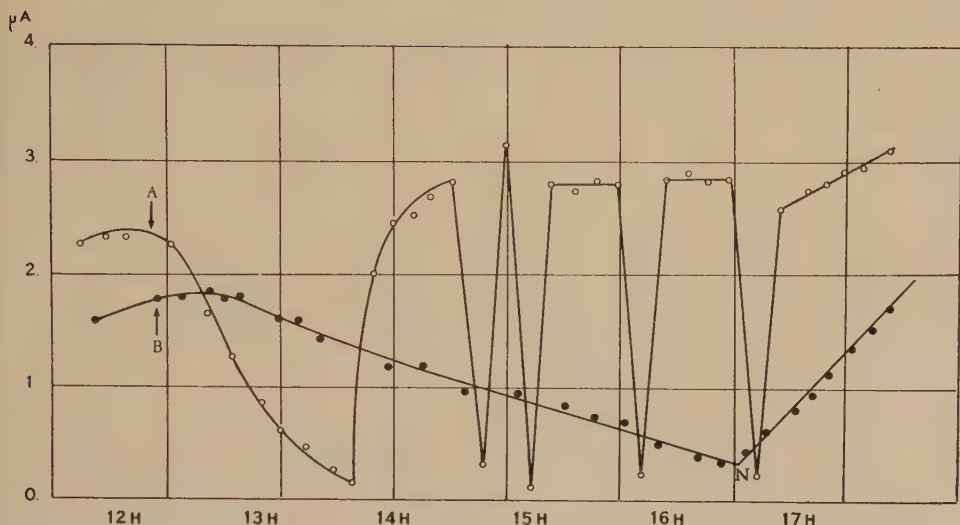


FIG. 6 : *Augmentation par la saponine de Quillaya (10^{-4}) de la perméabilité du nerf au calcium*

Deux préparations symétriques de sciatique-gastrocnémien isolés de Grenouille sont traitées, l'une en A par du liquide de Ringer sans calcium additionnée de saponine, l'autre en B par du liquide de Ringer sans calcium. La courbe o—o montre qu'en présence de saponine, la perméabilité au calcium devient rapidement très grande, car on passe du seuil maximal au seuil minimal entre deux mesures, suivant qu'on a mis la préparation en milieu calcique ou en milieu décalcifié. Il n'en est pas de même en l'absence de saponine (courbe ●—●) ; dans ce cas, les variations sont bien plus lentes. Abscisses : temps ; ordonnées : intensité rhéobasique en micro-ampères

Les mesures de rhéobase du sciatique (fibres motrices) sont effectuées avec une capacité de $10 \mu\text{F}$, le nerf étant plongé entre deux mesures dans le liquide de Ringer normal ou modifié, tandis que le muscle reste constamment en contact avec du liquide de Ringer normal.

Des essais préliminaires, au cours desquels nous avons suivi les variations d'excitabilité du nerf sous l'effet de la saponine de Quillaya à doses croissantes, nous ont montré que pour des concentrations inférieures à 0,05 %, cette substance n'entraîne pas de modification des paramètres.

1° Deux préparations sciatique-gastrocnémien prélevées sur le même animal sont traitées après stabilisation, l'une par du liquide de Ringer sans calcium, l'autre par le liquide précédent additionné de 0,01 % de saponine.

En procédant toutes les 10 minutes aux déterminations de la rhéobase, de la chronaxie et de la résistance du nerf, on constate que les variations de la chronaxie sont de faible amplitude et difficiles à interpréter. Par contre, la rhéobase de chacune des deux préparations décroît régulièrement, pour remonter lors du lavage au liquide de Ringer normal ; mais, et c'est là le fait le plus intéressant, l'examen comparatif des deux séries de résultats montre qu'en présence de saponine l'abaissement de rhéobase provoqué par le déficit en calcium du liquide utilisé se manifeste beaucoup plus rapidement, de même que se réalise également dans un temps plus court le rétablissement du paramètre à sa valeur initiale sous l'effet du lavage.

Les résultats sont exposés dans les courbes de la *figure 6*.

Sur les deux préparations différemment traitées, nous avons observé pour des valeurs suffisamment basses de la rhéobase l'apparition régulière de réponses répétitives suivies de contractions spontanément entretenues, fait depuis longtemps constaté au cours des expériences de décalcification.

2° Nous avons ensuite étudié l'action de la saponine dans un milieu renfermant un excès d'ions calcium. Après quelques expériences préliminaires, nous avons utilisé un liquide constitué par la solution de Ringer additionnée de 0,018 % de chlorure de calcium anhydre, ce qui donne une teneur totale de 0,030 % en ce sel au lieu de la teneur normale de 0,012 %.

L'examen des résultats schématisés par les courbes de la *figure 7* montre que l'élévation de la rhéobase consécutive à l'excès de calcium se manifeste avec beaucoup plus de rapidité en présence de saponine.

Dans ce dernier cas le maximum rhéobasique est atteint en 40 minutes ; on observe ensuite une tendance à la stabilisation. En l'absence de saponine, on constate que la rhéobase croît moins vite ; au bout de 2 heures, la valeur de ce paramètre n'a pas encore atteint un plateau.

En résumé, nous constatons que la présence de saponine à une dose non toxique pour le nerf, fait apparaître avec une plus grande rapidité les variations de rhéobase provoquées par l'excès ou le déficit en ions calcium dans le liquide où le nerf se trouve plongé.

Nous venons de voir que sur le nerf pourvu de son épinèvre (et en l'absence de saponine) les effets de l'immersion dans le liquide de Ringer sans calcium se traduisent par une baisse lente et régulière de la rhéobase qui, au bout de 9 à 11 heures, descend jusqu'à des valeurs voisines de $0,1 \mu A$ et l'on observe des contractions rythmiques et spontanées du muscle. Le remplacement du liquide de

Ringer sans calcium par la solution normale provoque une remontée régulière de la rhéobase qui reprend sa valeur initiale en l'espace d'une heure environ.

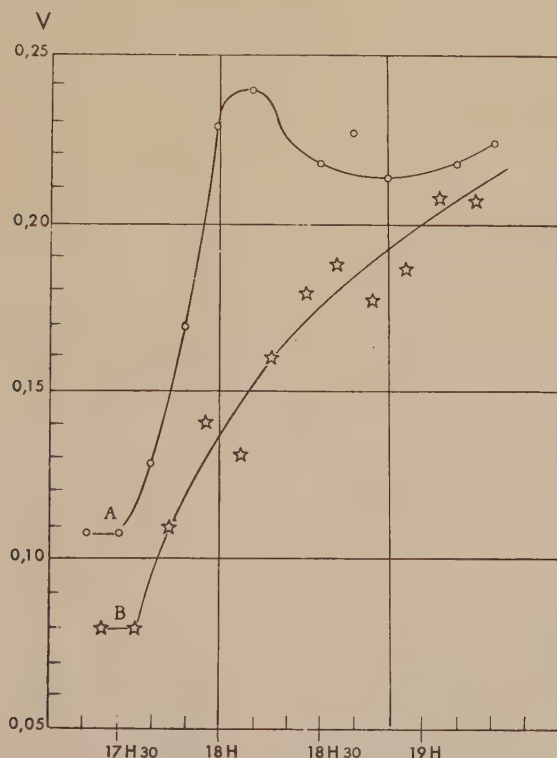


FIG. 7 : Augmentation sous l'effet de la saponine de Quillaya de la pénétration dans le nerf d'un excès de calcium

Courbe supérieure : nerf traité en A par du liquide de Ringer hypercalcique (1 g par litre de Cl_2Ca) additionné de saponine de Quillaya (0,1 g par litre).
 Courbe inférieure : préparation symétrique du même animal, placée en B dans du liquide de Ringer hypercalcique sans saponine

La pente de la courbe supérieure est plus rapide, montrant ainsi l'accroissement de perméabilité au calcium. Les deux courbes finissent cependant par se rejoindre à un même niveau rhéobasique imposé par la concentration en calcium du bain extérieur. Ordonnées : seuil rhéobasique (exprimé ici en volts, la résistance de la préparation restant constante)

Sur le nerf dépouillé, au contraire, les effets du milieu sans calcium se manifestent d'une façon bien plus rapide par les phénomènes décrits ci-dessus, corrélatifs de la décalcification du nerf, de telle sorte qu'une quinzaine de minutes suffisent pour en obtenir l'évolution complète.

Si l'on plonge alors un tel nerf dans la solution de Ringer normalement calcifiée, on voit des phénomènes d'autorythmicité rétrocéder et la rhéobase revenir aux alentours de sa valeur d'origine avec une aussi grande rapidité (moins de 10 minutes). Les résultats sont représentés par les courbes de la *figure 8*.

Notons qu'au cours de l'expérience, la chronaxie et la résistance du segment de nerf utilisé, sont restées sensiblement constantes.

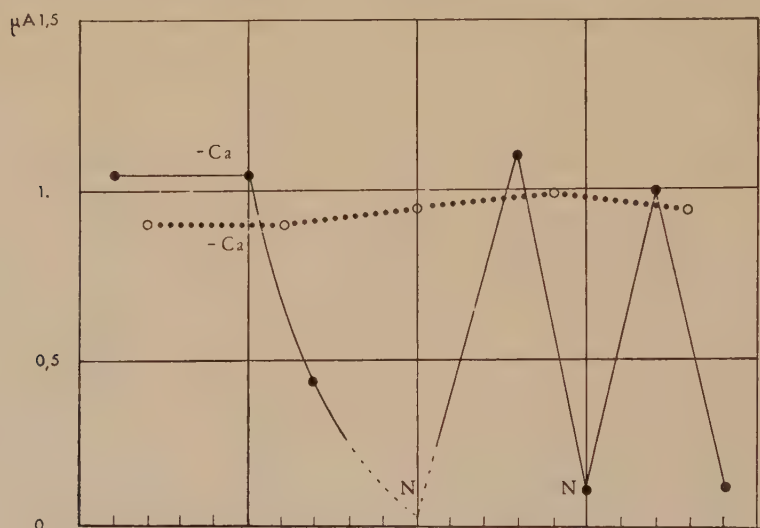


FIG. 8 : Augmentation instantanée de la perméabilité du nerf au calcium par dépouillement de l'épinèvre

Deux préparations symétriques de sciatique-gastrocnémien de Grenouille sont traitées par du liquide de Ringer sans calcium. Chez l'une, le nerf sciatique a été dépouillé de son épinèvre (trait plein). On voit que l'effet du défaut de calcium dans le bain se fait sentir immédiatement et qu'on revient sans délai à la rhéobase antérieure par traitement au liquide de Ringer normal (N)

Il n'en est pas de même dans le cas du nerf pourvu de son épinèvre (pointillé) où l'on n'observe pas de variation significative du seuil pendant le même laps de temps

(Ordonnées : intensité rhéobasique en micro-ampères ; abscisses : temps - une petite division = 5 minutes)

Bien entendu, par immersion ultérieure dans du liquide de Ringer sans calcium, les mêmes phénomènes se reproduisent avec régularité pour cesser immédiatement au contact du liquide de Ringer normal.

Lorsque dans la première partie de ces expériences, nous traitions les sciatiques de Grenouille par une solution de saponine à 0,01 % en milieu sans calcium, nous avons observé des phénomènes tout à fait comparables, avec cette différence que la baisse initiale de la rhéobase demandait un peu plus de temps (1 h 30 au lieu de 15 minutes) pour aboutir à des valeurs du même ordre.

La modification produite sur le nerf étant irréversible par lavage, il suffisait, sans plus ajouter de saponine aux bains, de traiter alternativement le nerf par des solutions de teneur normale en calcium, puis par des solutions décalcifiées pour observer d'une mesure à l'autre un brusque saut de la rhéobase initiale à une rhéobase extrêmement basse avec contractions spontanément entretenues.

En conclusion : on voit que le parallélisme est frappant entre l'action de la saponine sur le nerf et l'enlèvement de l'épinèvre.

Dans les deux cas, il ne semble pas douteux que l'on assiste à l'élimination d'une barrière physiologique à l'ion calcium.

Cette similitude des phénomènes nous permet de conclure que la saponine accroît la perméabilité du nerf aux ions calcium en agissant avant tout sur l'épinèvre.

Lorsqu'après un traitement suffisant par la saponine, la perméabilité aux ions calcium est devenue très grande, il n'y a pratiquement pas de différence à ce point de vue entre un nerf « dégainé et un nerf traité par la saponine ; cependant, comme nous l'avons signalé précédemment, la période d'établissement de cette perméabilité très grande est assez longue (1 h 30 en moyenne) et la première courbe de baisse de la rhéobase (segment B-N, *figure 6*), permet de suivre la cinétique du phénomène de perméabilisation.

Remarquons encore que les expériences en milieu enrichi en calcium sont moins nettement évidentes que celles en milieu appauvri en calcium car, dans ce dernier cas, le défaut de calcium lui-même, tend vraisemblablement à accroître lui aussi la perméabilité de l'épinèvre (rétroaction positive) tandis qu'en milieu hypercalcique l'excès de calcium tend à diminuer la perméabilité au calcium en excès (rétroaction négative).

Nous avons cherché par ailleurs à reproduire le phénomène de perméabilisation du nerf au calcium à l'aide d'autres substances tensio-actives.

Le *Tableau I* présente les résultats sous forme condensée.

Il faut noter que :

- 1° La plupart des substances utilisées sont toxiques pour le nerf et qu'en l'absence de toute modification du taux de calcium on a des variations du seuil.
- 2° Beaucoup de ces substances étant des produits industriels sulfonés contiennent de fortes proportions de sels (sulfate de sodium surtout) ce qui peut troubler les résultats.

L'action « toxique » sur le nerf n'est d'ailleurs pas autrement surprenante, puisque nous avons vu dans la partie physico-chimique que ces produits mouillants sont pour la plupart et à des degrés variables capables de « dissoudre » les micelles mixtes de lécithine -

cholestérol et même les cristaux de cholestérol. On peut donc penser que les lipides de la membrane plasmétique (et ceux de la gaine de myéline) subissent le même sort : la perméabilisation ne serait donc obtenue qu'au prix de lésions profondes de la membrane plasmétique qui serait en quelque sorte trouée par arrachement, tout au contraire de ce qui se passe avec la saponine ainsi que nous en discuterons ultérieurement.

Nous ferons une exception pour la lysocithine qui nous a donné d'excellents résultats n'étant pas toxique pour le nerf aux doses utilisées.

On sait que la lysocithine (ou lysolécithine) a été préparée par

MOUILLANT	C ^{ti} on	Effet seul à la concentration	Effet sur la perméabilisation au calcium	Observations
Dibromoricinoléate	10 ⁻³	0	+++	
Cholate de Na	10 ⁻³	0	0	
Taurocholate de Na	10 ⁻³	0	0	
Chaulmoograte Na	10 ⁻³	0	±	
Ac. Agaricique	10 ⁻³	0	faible	
Ricinoléate Na	10 ⁻³	élève rhéobase	?	toxique pour le nerf
Digitonoside	10 ⁻⁴	± baisse rhéob.	0	
Lysocithine	10 ⁻³	0	très accentués	très peu toxique pour le nerf
Sapamine M.S.	10 ⁻³	±	±	toxique
Hyamine 1622	10 ⁻³	élève rhéobase	±	toxique pour le nerf
- id -	3.10 ⁻⁴	élève rhéobase	effet diphasique	- id -
Invadine EL.	10 ⁻³	légère baisse rhéobase	nette	
Tibalène	10 ⁻³	baisse rhéobase	faible	toxique

TABLEAU I. — *Action de divers agents mouillants et tensioactifs sur la perméabilité du nerf au calcium*
(Action en milieu dépourvu de calcium)

Par « toxique pour le nerf », nous entendons qu'il y a perte de réponse à la stimulation électrique au cours de l'expérience, lorsque le nerf est en contact avec la substance étudiée

DELEZENNE et FOURNEAU (1914) par hydrolyse de la lécithine du jaune d'œuf sous l'influence des enzymes du venin de Cobra.

La lysocithine que nous avons utilisée a été préparée par nos soins suivant la méthode de Levene Rolf et Simms (1924) qui fait suivre l'hydrolyse d'une purification par passage à l'état de dérivé cadmique.

2) Essais de perméabilisation de l'épinèvre à d'autres substances que le calcium sous l'influence de la saponine

Les essais sont en général négatifs avec les substances liposolubles (chloroforme, hypnotiques, anesthésiques locaux, alcaloïdes). Ceci peut laisser à penser que ces substances pénètrent par passage trans-cellulaire et non intercellulaire.

Les résultats avec l'ion potassium sont peu nets ; il est vrai que le taux de potassium extérieur influence seulement de façon discrète les paramètres que nous avons étudiés.

Le magnésium, par contre, donne des résultats tout à fait comparables à ceux qui ont été obtenus avec le calcium en excès. Nous ne pouvons évidemment étudier l'effet de la saponine sur le manque d'ion magnésium car notre liquide physiologique normal n'en contient pas.

Les résultats de ces recherches sont condensés dans le *Tableau II*.

SUBSTANCE ETUDIÉE	Phénomène cinétique étudié	Concentration de la substance étudiée	Effet sur le nerf de la substance seule	Modification par addition de la saponine (10^{-4})	Effet perméabilisant mis en évidence
Ion K^{+}	Sortie du nerf	-----	-----	±	?
Ion K^{+}	Entrée d'un excès dans le nerf	0,1 % KCl	élève rhéobase	Elévation un peu plus rapide	faible
Ion Mg^{++}	Pénétration	0,1 % Cl_2Mg	élève rhéobase	Augmentation très notable de la vitesse du phénomène	très positif
Cocaïne	Pénétration	0,20 %	élève rhéobase puis bloc	Néant	nul
Quinine	Pénétration	1 %	élève rhéobase	Néant	nul
Strychnine	Essai de pénétration	0,1 %	0	Néant	nul
Chloral.	Pénétration	0,1 %	élève rhéobase	Néant	nul
Chloroforme	Pénétration	0,5 %	élève rhéobase	Néant	nul

TABLEAU II. — *Effet de la saponine de Quillaya sur la sortie ou la pénétration de substances diverses (Saponine 10^{-4} sur le nerf sciatique de Rana esculenta)*

II. — RECHERCHES CONCERNANT L'ACTION DE LA SAPONINE DE QUILLAYA SUR LES VAISSEaux CAPILLAIRES

Après avoir mis en évidence l'augmentation de la perméabilité à l'ion calcium de l'épinèvre du sciatique de Grenouille sous l'influence de la saponine de Quillaya, il était tout naturel de poursuivre l'étude de l'action de cette drogue sur d'autres structures de type endothélial.

Les capillaires sanguins qui nous ont fourni un matériel d'observation relativement aisé présentent des propriétés de perméabilité très différentes de celles de l'épinèvre.

Tout comme chez l'épinèvre, la perméabilité est passive (LANDIS, 1927 ; PAPPENHEIMER et SOTO-RIVERA, 1948); c'est-à-dire qu'elle ne requiert aucun phénomène de « transport actif ».

On admettra facilement ce point de vue si l'on considère que la traversée de la paroi capillaire par l'eau et les substances dissoutes s'effectue principalement au niveau des sutures interendothéliales (STURM, 1947 ; CHAMBERS et ZWEIFACH, 1940 qui contredisent KROGH, 1937).

Ici encore, les études physiologiques ne peuvent s'appuyer sur un support morphologique bien établi. Il semble généralement admis que la paroi des capillaires est constituée en réalité de deux couches : un tube endothélial et une membrane basale anhiste.

Le « tube endothélial » est constitué par une seule assise de cellules minces de forme losangique allongée, étroitement engrenées les unes dans les autres et dont on sait depuis longtemps que les limites sont colorables par traitement au nitrate d'argent (HOYER, 1865 ; AUERBACH, 1865 ; EBERTH, 1865 ; AEBY, 1865). Mais l'interprétation de cette réaction histo-chimique argentaffine donne lieu à bien des divergences.

Alors que CHAMBERS et ZWEIFACH (1947) admettent qu'elle est due à une substance cimentaire inter-cellulaire argyrophile, pour ELIAS (1952) cette opinion est dénuée de fondement précis. Cet auteur s'appuyant sur des travaux de LEWIS (1949) prétend que les ions argent se fixent sur les protéines plasmatiques retenues dans le « canal angulaire » constitué par l'angle solide sphérique rentrant que forme le raccordement de deux surfaces arrondies.

SOKOLOFF (1949) dit avoir pu mettre en évidence par une réaction ferrotannique les pores submicroscopiques que postulent CHAMBERS et ZWEIFACH.

Aussi, ne faut-il pas s'étonner que les arguments avancés pour expliquer le passage des substances à travers la paroi des capillaires conduisent à des explications multiples excluant tout compromis : pour ELIAS (1952) les substances dissoutes traversent sans aucun doute la lame protoplasmique endothéliale tandis que pour STURM (1949) et pour MULLER (1953) le passage est avant tout inter-cellulaire ; mais il faut noter toutefois que ces deux auteurs n'admettent pas la réalité du ciment inter-cellulaire décrit par CHAMBERS et alt.

La membrane basale est constituée selon les auteurs les plus affirmatifs (CLARA, 1955) par un réseau de fibrilles argentaffines entrelacées (*Gitterfasern*) et par une substance amorphe, géliforme, qui obture les mailles du réseau argentaffine. Ce film homogène ne serait pas une dépendance de l'endothélium (PLENK, 1927) mais constituerait l'analogue de la substance fondamentale des tissus conjonctifs. On peut d'ailleurs la colorer en rouge pourpre par la réaction de Hotchkiss-Mc Manus (HOTCHKISS, 1948 ; McMANUS, 1948) qui consiste à traiter la préparation par l'acide périodique puis par la fuschine bisulfitee.

D'après cette réaction, il semble possible d'affirmer qu'il s'agit de polysaccharides (DAY, 1947 *a* et *b*, 1952 ; WISLOCKI, BUNTING, DEMPSEY, 1947 ; DEMPSEY, BUNTING, SINGER et WISLOCKI, 1947 ; GERSH et CATCHPOLE, 1949 ; LEBLOND, 1950 ; Mc MANUS et CASON, 1950).

Il s'agirait d'après MEYER et RAPPORT (1951) d'acide chondroïtine-sulfurique et surtout d'acide hyaluronique (MEYER et ODIER, 1946 ; MEYER, ODIER et SIEGRIST, 1948) à l'état complexé avec les protéines.

La membrane basale, outre ses fonctions mécaniques de soutien du tube endothélial, pourrait jouer un rôle direct dans la perméabilité des capillaires par suite de création de zones localisées de plus grande perméabilité résultant d'une fluidification locale et transitoire de ses constituants géliformes (HUECK, 1936).

Nous adopterons la nomenclature des vaisseaux capillaires donnée par CHAMBERS et ZWEIFACH en 1944. Ces auteurs ont montré que les capillaires « vrais » n'unissent pas directement les artérioles et les veinules mais qu'ils sont placés en dérivation sur un canal central artériolo-veinulaire dont l'extrémité artérielle appelée métartériole possède des fibres lisses qui règlent son calibre.

L'entrée des capillaires vrais est commandée par un « sphincter » pré-capillaire lisse. De plus, il existe des anastomoses directes entre métartériole et veinule.

Cette disposition qui semble avoir une signification assez générale n'a toutefois été clairement montrée que pour les vaisseaux du mésentère.

Les mêmes auteurs ont étudié en 1940 (loc. cit.), les relations du ciment inter-endothélial avec la perméabilité capillaire. Ils concluent que c'est avant tout la stabilité de ce ciment inter-cellulaire, elle-même fonction du taux du plasma en ions hydrogène et calcium qui contrôle la perméabilité capillaire.

1) Action de la saponine de Quillaya sur les capillaires du mésentère de Grenouille

a) MÉTHODE :

Nous avons observé les capillaires du mésentère de Grenouille selon la technique donnée par ZWEIFACH (1934) qui consiste essentiellement à tendre le mésentère sur un support de liège en forme de fer à cheval disposé sur la platine d'un microscope. De cette façon, le mésentère et son support limitent une chambre humide accessible à la micro-manipulation par la face inférieure en passant par le côté ouvert du fer à cheval.

Les vaisseaux mésentériques sont perfusés par une canule (dépolie à l'acide fluorhydrique dilué pour lui donner plus d'adhérence) placée dans l'aorte abdominale, tandis que les deux crosses aortiques sont liées au-dessus de leur point de réunion d'où part également le tronc coélique.

La canule de sortie est placée dans la veine porte hépatique abor-dée par la veine médiane abdominale.

Le liquide de perfusion est constitué par une solution de Ringer⁵ additionnée de 3,5 % de poly-vinylpyrrolidone⁶, à pH 7,2-7,4, saturée d'oxygène à la pression atmosphérique. La perfusion est effectuée à l'aide d'une ampoule montée en vase de Mariotte à une pression de 40 cm d'eau.

Un ajutage latéral est prévu pour l'introduction des produits à essayer.

Les colorants sont dissous à la concentration de 1 % dans la solution physiologique et le pH ajusté à l'électrode de verre. Une suspension d'encre de Chine est préparée à 5 % par rapport au liquide commercial et abandonnée deux heures à la sédimentation pour éliminer les particules les plus volumineuses.

La saponine est, soit injectée avec le colorant (pour les colorants acides seulement, car les saponines triterpéniques sont des colloïdes négatifs qui flocculent en présence des colorants basiques), soit admi-

(5) ClNa 6,5 g ; ClK 0,14 g ; Cl₂Ca 0,12 g ; CO₃HNa 0,20 g ; PO₄Na H₂ 0,01 ; eau bidistillée q.s. pour un litre.

(6) « Subtosan » Specia.

nistrée par application à la surface du mésentère d'un petit fragment solide sous contrôle microscopique. Il va de soi que la solution de saponine est accompagnée soit d'encre de Chine soit de différents colorants mais non des deux à la fois.

b) RÉSULTATS :

On observe avant tout une contracture des sphincters pré-capillaires et des métartérioles qui survient en quelques minutes pour des concentrations de l'ordre de 10^{-3} en saponine. Cette contracture nous a semblé irréversible dans les conditions où nous opérons.

Il en résulte une stase complète définitive dans les territoires desservis par les vaisseaux occlus. Cette action est surtout nette par application localisée de saponine solide.

On peut attribuer ce phénomène à l'activité contracturante générale de la saponine sur les fibres musculaires de toutes catégories que nous étudierons ultérieurement.

Par introduction de la saponine dans le liquide de perfusion, bien que la répartition soit homogène, les réactions semblent variables suivant les territoires, mais ce n'est là sans doute qu'une apparence, car les aspects de vasodilatation peuvent provenir d'une constriction en aval provoquant une stase.

— *Action perméabilisante aux solutions aqueuses* : lorsqu'on dépose une microparcelle de saponine au voisinage d'un capillaire vrai, l'augmentation de perméabilité à l'eau de l'endothélium est rapide et importante. On observe la margination des particules d'encre de Chine en suspension et leur accumulation au niveau du ciment intercellulaire.

De même, le bleu trypan s'accumule à ce niveau, dessinant en noir-violet les contours des cellules endothéliales. Il faut préciser cependant que les figures décrites ci-dessus ne sont pas visibles sur toutes les préparations et que, de toute façon, elles ne le sont que pendant un temps bref, car en deux à trois minutes, l'accumulation des particules complique la stase d'origine vasomotrice pure ; la paroi capillaire prend un aspect tortueux et plissé témoignant d'une chute de pression, puis survient l'arrêt total de la circulation.

Ces phénomènes sont sensiblement les mêmes au niveau des vaisseaux plus importants, mais au niveau des métartérioles les déformations peuvent résulter en outre de la contraction des fibres lisses.

Administrée par perfusion, la saponine provoque surtout un œdème de l'intestin dont les capillaires sont plus sensibles à son action que ceux du mésentère ; malheureusement, les capillaires intestinaux ne se prêtent pas à l'observation microscopique.

— *Action perméabilisante aux colorants* : nous n'avons jamais pu observer, sous l'influence de la saponine, d'extravasation de colorants à grosses molécules qui restent normalement contenus entre les parois vasculaires (bleu trypan par exemple). Le bleu de toluidine traverse très rapidement la paroi endothéliale des capillaires et même celle des métartéριοles dont il colore les fibres musculaires lisses⁷.

Le vert janus B, dont la sortie est facilement mise en évidence par le pouvoir tinctorial qu'il possède vis-à-vis des éléments conjonctifs, voit son extravasation accélérée par traitement local à la saponine, mais d'une manière nullement plus accentuée que par stase d'origine mécanique ou par anoxie temporaire.

Dans ces conditions, nous pouvons considérer que l'amplitude de la perméabilisation ne dépasse pas celle que provoquent les phénomènes physiologiques. Cependant, dans une anse capillaire non perfusée en circulation normale, traitée par un fragment de saponine déposé à la surface, après les phénomènes de stase, on voit les hématies perdre progressivement leur hémoglobine et celle-ci diffuse dans toute la lumière du vaisseau (1 à 2 minutes).

Puis la teinte rouge homogène de celui-ci pâlit peu à peu à mesure que le pigment diffuse dans les espaces extra-vasculaire jusqu'à égalisation de teinte avec le reste du champ. Cette facilitation de la traversée des parois des vaisseaux par l'hémoglobine sous l'action de la saponine avait déjà été montrée par PONDER et HYMAN (1943) par une méthode différente.

2) Action de la saponine de Quillaya sur les capillaires du méso-appendix de Rat

Nous avons utilisé une méthode d'observation de même principe que la précédente due à ZWEIFACH (1948). Le méso-appendix est maintenu à 37° C par écoulement continu à sa surface de liquide physiologique iso-oncotique (nous avons utilisé dans ce but la polyvinylpyrrolidone) réchauffé dans un dispositif thermostatique.

Nous n'avons pas opéré de perfusion ; la saponine a été ajoutée à l'état de fragment solide à la pointe d'une aiguille courbe et sous contrôle microscopique. On observe des réactions vasomotrices de même nature que chez la Grenouille, mais sensiblement plus rapides.

(7) Si à une préparation ainsi imprégnée de bleu de toluidine, on donne la teinte métachromatique lilas par addition d'une trace d'héparine, on peut suivre la diffusion de la saponine ajoutée ultérieurement, car celle-ci fait réapparaître la teinte bleue initiale du colorant. On peut voir ainsi que la saponine diffuse immédiatement à travers toute l'épaisseur du mésentère. Cette propriété « antimétachromatique » de la saponine n'est d'ailleurs pas du tout spécifique, les autres mouillants font de même ainsi que les solutions salines concentrées.

On a souvent comparé les saponines aux venins des serpents quant à leurs actions cardiotoxique et lytique (voir p. ex. SARKAR, 1951). Nous avons donc déposé parallèlement des fragments de venin de Vipère sec et de saponine sur des méso-appendix de Rat. La réaction au venin de Vipère a été toute différente de celle à la saponine. Après un temps de latence de quelques minutes, il apparaît une vaso-dilatation marquée ; le courant sanguin s'accélère, puis apparaissent des ruptures multiples de la paroi endothéliale qui laissent filtrer des nappes hémorragiques. Nos observations rejoignent celles un peu différentes de BOQUET et DELAUNAY (1942).

L'action hémorragique du venin de vipère est classiquement limitée aux organismes homoeothermes (FLEXNER et NOGUCHI, 1903). Quelques expériences sur la Grenouille nous ont montré que les capillaires de cet animal étaient bien légèrement sensibles à l'hémorragine, mais que ce principe, probablement un enzyme, agissait beaucoup plus lentement. Entre temps, d'autres constituants du venin ont eu le temps d'agir ; la circulation est arrêtée et il n'y a plus de pression capillaire depuis longtemps lorsque les brèches se font jour. Ainsi ne peut-il y avoir hémorragie. Il est logique de supposer que la réaction de lyse de la paroi est plus lente chez la Grenouille que chez le Rat, parce que la température est plus basse. Toutefois, des essais de maintien à 37°C de grenouilles traitées par le venin de Vipère ne nous ont donné aucun résultat.

3) Action de la saponine de Quillaya sur les vaisseaux capillaires du poulmon

L'action toxique des saponines et principalement de celle du Quillaya sur les poissons et les têtards est connue depuis longtemps, depuis les travaux de KOBERT (1904), JAKOBSON (1919) et KOFLER (1922).

KOFLER et SCHRUTKA (1925) ont même proposé un « index poison » (Fischindex) pour caractériser les différentes saponines.

Les travaux d'OVERTON (1913 et 1918) ont montré que sur les têtards, l'action toxique de la saponine se manifestait d'abord par une attaque de la surface respiratoire branchiale suivie d'une extravasation de plasma ; en somme, l'équivalent d'un œdème aigu du poulmon. OVERTON a pu prouver que la mort des animaux était bien due à la perte saline en maintenant en survie, malgré une dose rapidement mortelle de saponine, des têtards plongés dans un liquide physiologique ioniquement équilibré avec le plasma.

Par contre, par injection intraveineuse de doses mortelles de saponine de Quillaya aux animaux supérieurs, on a décrit des lésions cardiaques et attribué la mort à une paralysie respiratoire (KOBERT, 1887 ; PACHORUKOW, 1888 ; KRUSKAL, 1891, puis BRANDL, 1906),

mais à notre connaissance, on n'a jamais décrit avant nous (1954) l'œdème pulmonaire par injection intraveineuse.

a) ŒDÈME PULMONAIRE EXPÉRIMENTAL PAR LA SAPONINE DE QUILLAYA CHEZ LA SOURIS :

Il est habituel de considérer que l'activité toxique des saponines résulte de leurs propriétés hémolytiques et contracturantes du cœur.

Cependant, administrant des doses variées de saponine par voie intraveineuse à des souris, nous avons remarqué pour les fortes doses (0,3 ml de solution à 1 %) une mort rapide de l'animal après une forte dyspnée.

L'autopsie montre des taches d'aspect hémorragique sur le poumon dont l'ouverture décèle un œdème alvéolaire marqué avec des extravasations importantes. Dans certains cas, le liquide sanguinolent, laqué, sourd spontanément dès section de la trachée. Cependant, des coupes pratiquées par les méthodes habituelles d'inclusion ne montrent pas de lésions importantes du poumon.

Lorsque l'injection de saponine est accompagnée d'administration préalable ou simultanée de bleu trypan à 1 %, ce colorant teinte en bleu le liquide extravasé, ce qui rend l'œdème beaucoup plus visible et nous a permis de le caractériser facilement.

b) ŒDÈME PULMONAIRE PAR LA SAPONINE CHEZ LES BATRACIENS :

La structure du poumon de batracien nous a semblé très favorable à la mise en évidence du passage de diverses substances à travers une paroi capillaire traitée ou non par des agents pharmacologiques. En effet, tapissée d'un riche réseau capillaire, ce poumon, qu'il soit de type unilobulaire (Grenouille) ou même unialvéolaire (Triton) a la forme générale d'un sac d'où il est facile d'extraire les liquides qui ont pu y transsuder. De plus, la forme très simple de ces poumons permet de prélever des fragments de surface respiratoire qui soient à peu près développables, c'est-à-dire applicables sur un plan sans faire trop de plis.

Nous avons utilisé pour nos recherches des grenouilles vertes (*Rana esculenta* L.) et des tritons marbrés (*Triturus marmoratus* Latreille).

Les réactifs ont été administrés par injection directe dans l'artère pulmonaire, ainsi qu'il est décrit ci-après :

Abord de l'artère pulmonaire chez la Grenouille :

Une grenouille d'au moins 40 grammes est décérébrée et démédullée. La peau de la face ventrale est fendue sur sa ligne médiane

et une des deux moitiés est réclinée latéralement. On ouvre un volet de ce côté par incision de la ligne médiane du sternum et deux incisions perpendiculaires. Au cours de cette opération, on a soin de sectionner les insertions des muscles du pharynx et on évite de léser la veine grande-cutanée. On pose une ligature provisoire, sans contre-nœud, à la base de l'arc aortique du côté envisagé, puis, dégageant les séreuses, on repère le tronc pulmo-cutané sous lequel une ligature est préparée. Il ne reste qu'à percer tangentiellement le tronc pulmo-cutané avec une aiguille courbe, à introduire la canule dont on engage la pointe dans l'origine de l'artère pulmonaire et à serrer la ligature préparée, tandis que celle de l'arc aortique est enlevée. La base du ventricule est ensuite fendue pour constituer un orifice de sortie ; on peut encore, ce qui est préférable, fixer une canule de sortie dans l'oreillette gauche. Le dispositif de l'expérience est schématisé (fig. 9-1).

Abord de l'artère pulmonaire chez le Triton :

Bien que la disposition schématique des arcs aortiques chez le Triton soit tout à fait semblable à celle de la Grenouille, au moins dans les grandes lignes, de petites différences de détail rendent la technique ci-dessus impossible. En effet, chez le Triton, les deux arcs volumineux sortant du bulbe aortique restent unis en une masse en forme de pain fendu, de la grosseur du ventricule. L'extrémité distale de ces arcs pénètre dans une couche conjonctive accolée à la face ventrale du pharynx, dans l'épaisseur de laquelle ils se séparent pour émettre immédiatement les trois troncs habituels qui cheminent dans l'épaisseur de la paroi pharyngée (voir fig. 9-2).

Nous avons donc adopté la technique suivante : les troncs carotidien et aortique du côté choisi sont ligaturés après avoir été mis à nu par incision de la paroi ventrale du pharynx (fig. 9-2). On place alors sans difficulté une canule dans l'arc aortique primitif correspondant (fig. 9-3).

Préparation des solutions à injecter :

Les solutions de saponine et de bleu trypan ou de rouge vital sont effectuées dans un liquide physiologique équilibré auquel on ajoute un colloïde en quantité suffisante pour réaliser un milieu isotonique au plasma de l'animal.

Nous avons utilisé, comparativement dans ce but, les trois liquides suivants ajustés à pH 7,2-7,4 et saturés d'oxygène à la pression normale.

1) Liquide au sérum normal :

— Sérum normal (cheval)	50 ml
— Chlorure de sodium à 9 p. 1.000	31 ml
— Eau distillée	19 ml

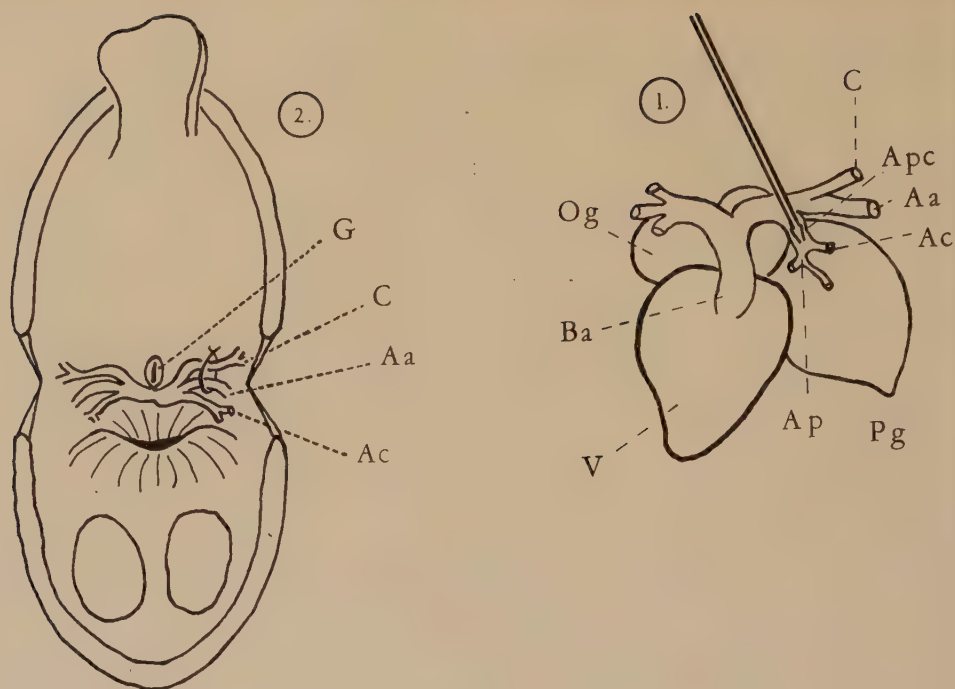
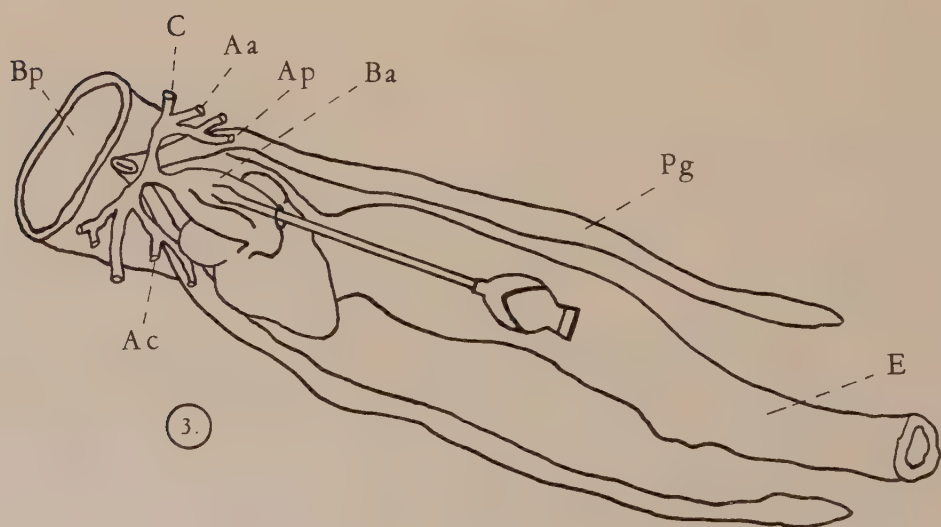


FIG. 9 : Technique d'abord de l'artère pulmonaire chez la grenouille (1) et chez le Triton (2) et (3)

Aa : arc aortique ; Ac : artère cutanée ; Ap : artère pulmonaire ; Apc : arc pulmo-cutané ; Ba : bulbe aortique ; Bp : cavité bucco-pharyngée ; C : arc carotidien ; G : glotte ; Og : oreillette gauche ; Pg : poumon gauche ; V : ventricule



2) Liquide au sérum délipidé :

— Sérum délipidé (sec) selon HEWTH (1927)	4 g
— Liquide de Ringer	100 ml

3) Liquide avec polyvinylpyrrolidone :

— Polyvinylpyrrolidone	1,75 g
— Liquide de Ringer	100 ml

Injection des solutions :

On injecte 0,10 ml de la solution de saponine à étudier, quantité largement suffisante pour emplir les vaisseaux du poumon. Après contact de 1 minute 30 secondes, on injecte 0,20 ml de la même solution sans saponine, puis deux fois 1 ml de solution de bleu trypan à 1 % (ou de rouge vital à la même concentration) dans le même solvant à la vitesse de 1 ml par minute et le plus régulièrement possible. On lave ensuite avec 0,5 ml de solution sans saponine.

Dans le cas où un œdème marqué a été obtenu, la bouche de l'animal est remplie d'un liquide spumeux coloré qui sort par la glotte.

Lorsque l'œdème est plus discret, nous le mettons en évidence en gonflant le poumon par la glotte, l'excisant entre deux ligatures. Après ouverture et étalement du poumon sur une plaque de verre, nous en prenons l'empreinte avec un papier filtre blanc (*fig. 10*).

RÉSULTATS

Concentration limite pour obtenir une extravasation :

— Avec le milieu n° 1 au sérum normal, la concentration seuil de saponine avec le passage du bleu trypan est de 10^{-3} .

— Avec les milieux n° 2 et n° 3 au sérum délipidé et à la polyvinylpyrrolidone, on obtient déjà des traces d'œdème pour des concentrations respectives en saponine de 10^{-4} et 10^{-6} .

Pour la concentration en saponine de 10^{-4} , on a donc :

- en milieu sérum normal : pas d'extravasation ;
- en milieu sérum délipidité : traces de passage de colorant ;
- en milieu avec polyvinylpyrrolidone : œdème et extravasation de colorant.

L'action inhibitrice très nette qu'exerce le sérum normal à l'égard de l'effet de la saponine est due évidemment aux lipides. Nous discuterons plus loin du rôle des deux autres milieux colloïdaux.

Examen microscopique des préparations :

Nous avons cherché à voir à quel niveau le colorant quittait les capillaires. Pour cela, l'expérience est effectuée comme pour les injec-

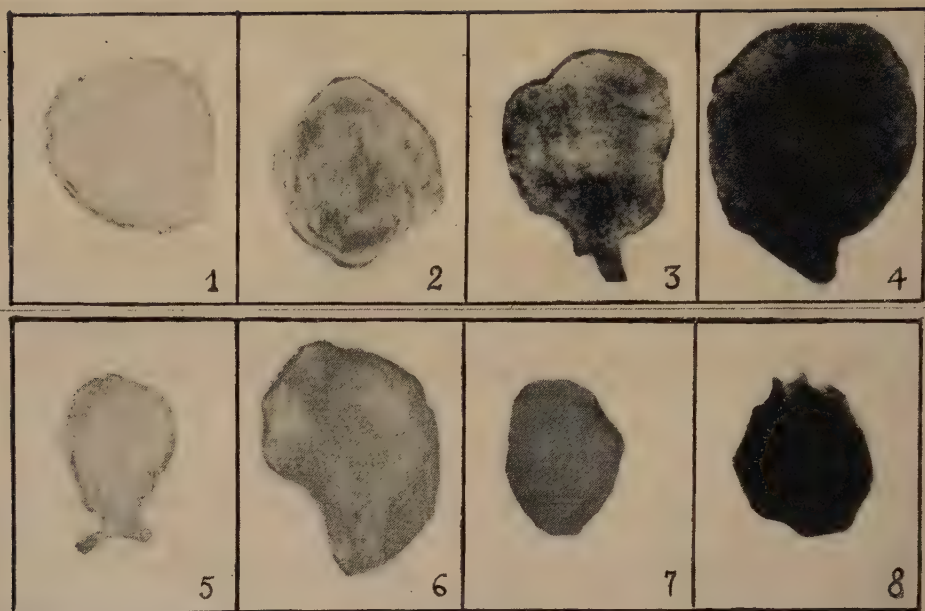


FIG. 10 : *Passage de bleu Trypan à travers les capillaires du poumon de la grenouille, sous l'action de la saponine de Quillaya*

(Les taches sont les empreintes laissées par le poumon excisé sur un papier-filtre)
En haut : 1 : témoin sans saponine ; 2 : saponine 10^{-7} ; 3 : saponine 10^{-5} ; 4 : saponine 10^{-4} . *En bas* : influence de la nature du colloïde ajouté, 5 : témoin sans saponine ; 6 : sérum normal ; 7 : sérum délipidé ; 8 : polyvinylpyrrolidone, ces trois derniers additionnés de saponine (10^{-4})

tions dans l'artère pulmonaire, mais le dernier lavage au liquide physiologique est très réduit (0,1 ml) et poussé très lentement. Il faut, en effet, enlever la majeure partie du colorant resté dans la lumière des capillaires sans rejeter dans la cavité pulmonaire ou balayer dans la circulation les colorant en train de traverser la paroi aux limites intercellulaires.

Le poumon est ensuite gonflé, excisé entre ligatures, fixé aux vapeurs osmiques, lavé et durci à l'alcool, puis découpé en fragments qui sont montés au baume après déshydratation.

Sur les préparations réussies, on peut voir le colorant traverser aux limites des cellules endothéliales des capillaires et même sur certaines aux limites de l'épithélium respiratoire. Nous n'avons jamais

observé d'accumulation de colorant entre les capillaires et l'épithélium respiratoire qui semblent de ce fait très étroitement accolés (*fig. 11-1*).

c) ACTION DE LA SAPONINE SUR L'IMPRÉGNATION ARGENTIQUE DES CAPILLAIRES PULMONAIRES :

Si l'on admet qu'au cours de l'œdème pulmonaire provoqué par la saponine, c'est le ciment intercellulaire qui voit sa porosité accrue, il nous a semblé logique d'étudier les modifications de l'argentophilie de ce ciment sous l'influence de la saponine.

Les méthodes classiques d'argenture des endothéliums s'adressent à l'épithélium respiratoire de batracien que l'on traite par le nitrate d'argent, selon RANVIER (*fig. 11-4*). Cette méthode est peu appropriée à l'étude des capillaires.

En effet, le nitrate d'argent pénètre mal lorsqu'il est appliqué à l'extérieur de la préparation ; de telle sorte que si l'on a une bonne imprégnation de l'épithélium respiratoire, les limites des cellules endothéliales des capillaires sont toujours incomplètes et difficiles à distinguer de celles de l'épithélium. D'autre part, le nitrate d'argent altère les noyaux.

Aussi, avons-nous mis au point une méthode dérivée de celle d'ALFEROW (1874) : les vaisseaux pulmonaires de l'animal (Triton) préparé comme précédemment sont d'abord lavés pour éliminer le plus possible d'hématies à l'aide de quelques ml de liquide de Ringer, puis avec la solution de lavage suivante ajustée à pH 7,2-7,4 :

A	{	— Lactate de sodium	16 g
		— Lactate de calcium	0,25 g
		— Eau distillée	q.s.p. 1.000 ml

On injecte ensuite 1 cm³ du liquide d'argenture :

B	{	— Lactate d'argent	1,2 g
		— Lactate de calcium	0,25 g
		— Lactate de sodium	15 g
		— Eau distillée	q.s.p. 1.000 ml

Après une minute, on lave abondamment le poumon au liquide A, puis à l'eau distillée. Le poumon est alors gonflé et excisé entre deux ligatures. L'argent fixé est réduit en baignant le poumon dans un révélateur photographique assez lent pour ne pas donner trop de grain (Kodak D-76 par ex.), en surveillant le degré de réduction au microscope binoculaire à faible grossissement.

Quand toutes les limites cellulaires sont bien imprégnées, on lave l'extérieur du poumon à l'eau distillée, on fixe aux vapeurs osmiques, on lave à l'eau et durcit à l'alcool. On peut alors découper des fragments de poumon pour le montage au baume après coloration éventuelle.

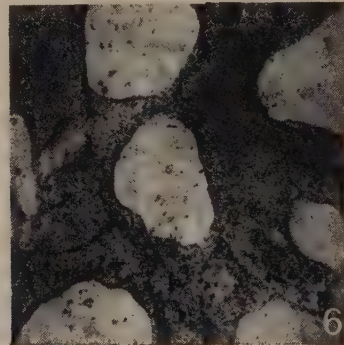
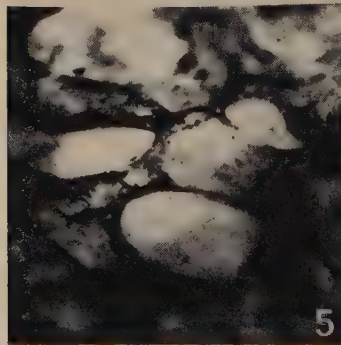
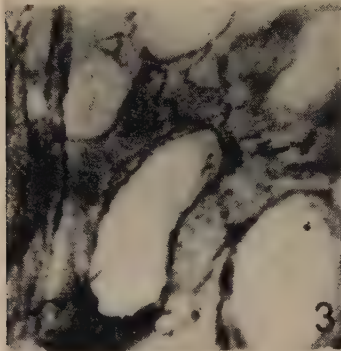
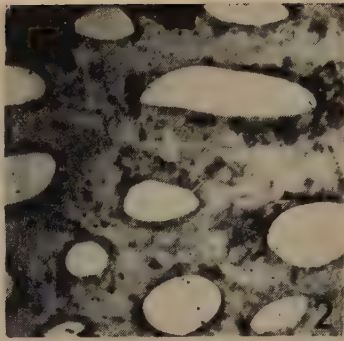
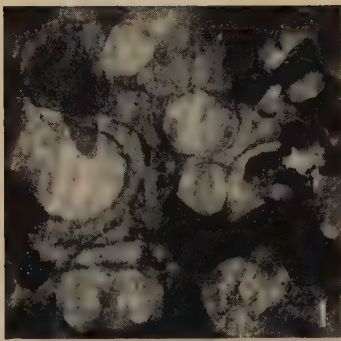


FIG. 11 : Action de la saponine de Quillaya sur les capillaires pulmonaires de batraciens.

1. Passage de rouge vital à travers les capillaires pulmonaires du Triton. Les lignes d'extravasation présentent un tracé qui rappelle celui que fournit l'imprégnation argentique après action de la saponine (cf. 5 et 6 ci-dessous). (Injection dans l'artère pulmonaire suivant technique décrite dans le texte. Saponine 10^{-4}).
2. Poumon de grenouille traité par le bleu de prusse oxalique en présence de saponine (10^{-4}). Le colorant ne traverse pas.
3. Imprégnation argentique intravasculaire (Grenouille). Seul l'endothélium vasculaire est imprégné.
4. Imprégnation argentique de l'épithélium respiratoire (Triton). On voit nettement les contours des cellules de l'épithélium ; les points de jonction de plusieurs cellules (3 ou 4), sont en général situés au niveau des fossettes intercapillaires (bordées d'une frange sombre) qui sont en creux par rapport aux capillaires formant des tubes anastomosés en saillie dont les limites cellulaires ne sont pas imprégnées par cette technique.
5. et 6. Imprégnation argentique intravasculaire (Grenouille) après action de la saponine. On ne voit plus que des restes de limites cellulaires dont l'aspect est comparable à celui des lignes de passage des colorants (cf. 1, ci-dessus).

L'imprégnation d'une paroi normale donne une image nette où les sutures endothéliales sont minces et continues (*fig. 11-3*).

Au contraire, une préparation qui a été traitée par la saponine à la concentration de 10^{-4} en milieu polyvinylpyrrolidone par exemple, ne laisse voir que des lambeaux de sutures cellulaires qui sont élargis ou dessinent des lignes pointillées (*fig. 11-6*). De grandes plages du réseau capillaire peuvent être rendues invisibles.

Nous avons pu observer, d'autre part, qu'il n'y a aucune solution de continuité dans la paroi des capillaires traités par la saponine à une dose suffisante pour provoquer une extravasation de colorant. Si, en effet, on injecte en même temps que la saponine du bleu de Prusse oxalique dialysé qui ne traverse absolument pas la paroi capillaire, le colorant, en se déposant régulièrement sur la paroi qu'il rend visible, montre l'absence de brèche (*fig. 11-2*).

Il semble donc se produire, sous l'effet de la saponine, une atteinte d'une substance cytotimentaire dont la nature nous échappe encore. Les épaisissements résultent probablement d'une fixation d'argent sur la saponine elle-même fixée chimiquement ou simplement adsorbée.

III. — DISCUSSION

SUR LE MODE D'ACTION DE LA SAPONINE AU NIVEAU DES STRUCTURES ENDOTHELIOIDES

Il semble bien établi que la saponine agit sur l'épinèvre en augmentant la perméabilité du ciment intercellulaire. En effet, l'action de la saponine rend l'épinèvre plus perméable aux substances typiquement lyophiles (ions minéraux), tandis que les substances liposolubles (anesthésiques locaux, hypnotiques, alcaloïdes) ne voient pas leur passage notablement accéléré.

Or il est vraisemblable que ce dernier type de substance pénètre en passant à travers la lame protoplasmique des cellules elles-mêmes et non aux sutures intercellulaires (PAPPENHEIMER, 1953).

Dans le cas de l'endothélium capillaire, les phénomènes sont compliqués par l'interférence des réactions vasomotrices. Cette action motrice de la saponine sur les vaisseaux du mésentère est nette, mais son sens n'est défini que pour un territoire déterminé et très restreint, surtout lors de l'administration par voie vasculaire ; et cela fait penser à une pluralité de mécanismes.

Il est vraisemblable que la saponine peut en premier lieu provoquer la libération des substances physiologiquement actives à partir des tissus perfusés. On peut ainsi mettre en évidence une action

histaminolibératrice sur le poumon de Cobaye (G. VALETTE, observations non publiées). La présence de cette histamine pourrait expliquer en partie l'action perméabilisante et certains phénomènes vasomoteurs (voir aussi EULER et STJARNE, 1955).

Nous avons vu, d'autre part, que les concentrations limites de saponine susceptibles de provoquer une extravasation de colorant sont très variables suivant la nature du colloïde du liquide de perfusion.

Il suffit, pour obtenir ce phénomène en présence de polyvinylpyrrolidone, d'une dose de saponine bien plus faible que celle qui est nécessaire pour réaliser le même effet en présence de protides sériques.

Il est tentant de rapprocher ces résultats de ceux que nous avons obtenus au cours de mesures physicochimiques et qui montrent que la présence de protéine peut inhiber l'abaissement de tension superficielle provoqué par la saponine, tandis que la polyvinylpyrrolidone agit en sens inverse en renforçant cette baisse de tension (voir partie physicochimique). Peut-être n'est-il pas interdit de voir là une des causes des lésions provoquées par la P.V.P. sur certains tissus particulièrement sensibles (VALETTE, RUCART et COHEN, 1957), comme de l'activité histamino-libératrice de ce composé chez certains animaux (HALPERN et NEVEU, 1955).

Quoi qu'il en soit, ces résultats permettent de penser que la tensio-activité de la saponine suffit à expliquer le mécanisme de l'œdème alvéolaire qu'elle produit. Or, les capillaires du poumon sont particulièrement sensibles à l'action de la saponine qui permet le passage à travers leur paroi de colorants à grosse molécule (bleu trypan, rouge vital), alors que ces mêmes colorants ne traversent pas la paroi des autres capillaires traités de la même manière. Pourquoi donc cette différence? On pourrait l'attribuer au fait que l'épithélium respiratoire est très perméable et que tout se passe comme si les capillaires pulmonaires étaient directement au contact de l'air. Cet épithélium serait même réduit souvent à quelques « épicytes » (CLARA, 1936).

Dans ces conditions, il existerait nécessairement des interfaces plasma-air au niveau desquelles pourraient agir les substances tensio-actives.

Au contraire, les parois des capillaires des autres organes ne séparent jamais que deux milieux liquides miscibles, ce qui expliquerait leur moindre sensibilité et, en fait, lorsque nous provoquons un œdème pulmonaire avec extravasation de colorant, ce colorant ne s'accumule jamais dans un tissu conjonctif dont nous pourrions supposer l'existence entre les capillaires et l'épithélium respiratoire. On peut d'ailleurs tout aussi bien considérer que c'est l'épithélium respiratoire qui sépare le milieu vivant aqueux de l'air alvéolaire; le capillaire pulmonaire serait alors entouré, lui aussi, d'un milieu liquide

et les interfaces sur lesquelles agiraient les corps tensioactifs se trouveraient, dans ce cas, situées au niveau des sutures de l'épithélium respiratoire, ce qui ne fait que reculer le problème.

Dans les deux cas, une grave critique peut intervenir ; car si l'on fait jouer à la tension superficielle un rôle primordial dans le mécanisme qui assure la contention de la phase aqueuse à l'intérieur du volume intravasculaire, on comprend mal la possibilité, cependant confirmée par l'expérience, de la résorption d'eau par la surface respiratoire. En effet, la présence d'une quantité notable de liquide aqueux dans la cavité alvéolaire devrait détruire l'interface de contact liquide-gaz ; il en résulterait, dans notre précédente hypothèse, un accroissement de la quantité de liquide extravasé au lieu d'une absorption. POLICARD (1952) admet d'ailleurs la présence d'une couche aqueuse sur la surface respiratoire.

Nous sommes donc conduit à penser que l'abaissement de la tension superficielle du liquide de perfusion ne suffit pas à expliquer l'extravasation sinon de l'eau, du moins des colorants à grosse molécule.

Il est encore moins vraisemblable de supposer que la saponine agit par inhibition d'une résorption d'eau qui s'effectuerait normalement à travers les cellules endothéliales capillaires par transport actif et qui équilibrerait habituellement la filtration à travers les pores. De toute façon, les corps à grosse molécule pourraient difficilement être impliqués dans un semblable processus.

Force nous est bien de considérer que c'est au niveau du ciment reliant les cellules endothéliales entre elles que la saponine agit ; mais on imagine malaisément, par contre, que l'action de la saponine sur la substance cytocimentaire puisse résulter d'une combinaison avec le cholestérol.

Le peu qu'on sait sur cette substance cytocimentaire (et encore de façon très indirecte) laisse à penser qu'elle se rattache d'une façon générale aux mucoprotéides.

La saponine agirait dans ce cas comme une simple substance tensioactive dont l'adsorption sur un milieu poreux augmente non pas le diamètre réel des pores, mais le diamètre hydrodynamiquement actif, peut-être par le jeu du déplacement d'une couche de protéines précédemment adsorbées et beaucoup plus volumineuses, ou encore par la mise en œuvre des divers mécanismes bien étudiés sur les « modèles physiques ».

Il est bien évident d'ailleurs que la nature exacte de cette action ne pourra être élucidée que lorsque l'on connaîtra suffisamment la composition chimique et la structure physique de la substance « cytocimentaire ».

Notons aussi qu'on obtient par la saponine des extravasations de bleu trypan, aussi bien chez la Souris que chez les batraciens et que nous avons montré que, chez ces derniers, c'est au niveau des limites cellulaires que passent les colorants.

Or certains auteurs considèrent que les capillaires pulmonaires des mammifères conservent le type embryonnaire, c'est-à-dire qu'ils sont constitués d'une lame protoplasmique continue ne possédant pas de limites cellulaires (ou du moins pas de limites cellulaires imprégnables à l'argent) (POLICARD, 1952).

La similitude d'action de la saponine sur les deux sortes de poumons nous semble démontrer que les capillaires pulmonaires des mammifères présentent bien la structure cellulaire habituelle, selon la conception d'EBERTH (1865).

ACTION DE LA SAPONINE DE QUILLAYA SUR LES FIBRES MUSCULAIRES

Travaux antérieurs

En 1867, PELIKAN signale la paralysie locale produite par la saponine par injection dans la patte d'une grenouille. Il fait incidemment mention de la raideur du membre paralysé, mais il songe surtout à comparer la saponine au curare (upas antiar) en suivant les protocoles de ligatures si judicieusement mis à profit par Claude BERNARD.

Il faut remonter à LAUTENBACH (1879) pour trouver la première étude explicite de l'action musculaire de la saponine. Cet auteur stimulait par courants faradiques un gastrocnémien de Grenouille (*Rana pipiens*) préalablement dénudé. Il appliquait ensuite une solution de saponine à 10 p. 100 (en réalité, un décocté mal défini d'une plante non indiquée) et en une heure et demie l'excitabilité avait disparu.

Il obtient les mêmes phénomènes sur des muscles de pigeon ou de mammifères dans lesquels une solution de saponine est injectée et qui entrent en contracture.

LAUTENBACH écrit déjà que la saponine « stimule » par elle-même et de façon permanente le muscle injecté qui devient de ce fait insensible à une stimulation électrique ultérieure. Il décrit l'allure progressive de la contracture et note que les fibres immédiatement atteintes présentent des lésions visibles au microscope. C'est d'ailleurs l'aspect morphologique qui retient surtout l'attention des auteurs des quarante années qui suivent si l'on s'en réfère aux travaux de KOBERT (1887) et de ses élèves PACHORUKOW (1888), ATLESS (1888), TUFANOW (1888), puis à ceux de BRANDL (1906) et de NEUMAYER (1908). De même, OVERTON (1913) s'est attaché tout particulièrement à l'étude des phénomènes de gonflement qui, à cette époque, suscitaient beaucoup de recherches de la part des physiologistes.

Il montre que l'absorption d'eau par les fibres musculaires striées plongées dans un milieu hypotonique est notablement accrue en présence de saponines et que cet accroissement se manifeste bien avant que ne surviennent les altérations visibles au microscope ou des changements d'excitabilité.

Il faut arriver à SANTESSON (1925) pour trouver une étude proprement physiologique et relativement précise de l'action des saponines sur le muscle. Cet auteur met en évidence que la contracture qu'on obtient est accentuée par stimulation faradique, tandis que la cocaïne l'inhiberait au moins partiellement. Pour une certaine concentration (l'auteur précise : 0,063 %), les secousses obtenues par stimulation électrique se superposent à la contracture par la saponine, si bien que la somme des deux dépasse l'amplitude de la contraction normale maximale. L'auteur interprète ces observations en fonction de la théorie biochimique de MEYERHOF (1926 et 1927) de la contraction musculaire.

Arrivé à ce point de notre exposé, il nous faut bien dire que les premiers expérimentateurs croyaient qu'il n'existait qu'une seule saponine de répartition ubiquiste ; et ils étaient confirmés dans cette croyance par la grande similitude des propriétés physicochimiques et physiologiques de ces composés qui sont loin de posséder pour autant des structures chimiques très proches. Par la suite, les auteurs ont souvent oublié de faire mention de la nature de la saponine objet de leurs investigations.

L'action des différentes saponines sur le cœur a été très étudiée à cause de la parenté structurale de certaines d'entre elles avec les glucosides cardiotoniques. Citons parmi les travaux anciens un ouvrage de KOBERT (1904) qui montre que la saponine de *Quillaya* provoque une contracture progressive du cœur d'*Aplysie*. WEINBERG (1918), dans un tableau récapitulatif général des propriétés des saponines et de leurs dérivés sur le cœur de Grenouille, fournit la dose toxique, la dose-seuil d'inhibition des battements, la dose-seuil d'augmentation des battements pour 38 saponines et sapogénines.

Nous discuterons plus loin des travaux de GOTTDENKER et ROTHBERGER (1937) et de ceux de BLUMENCRON (1941) qui précisent le décours de l'action des saponines sur le cœur.

Travaux personnels

Au point où nous commençons notre étude, l'action contracturante des saponines est bien cataloguée ; on sait que la stimulation électrique l'augmente.

On ne lui connaît pas d'inhibiteurs (SANTESSON dit que la cocaïne l'inhibe, mais il semble qu'il se soit trompé) et on n'a avancé que des hypothèses très risquées sur son mécanisme. C'est précisément le mécanisme de cette contracture que nous essaierons d'élucider. Notre effort s'est surtout porté sur les muscles striés dont la physiologie est mieux connue et l'abord expérimental plus facile à l'échelle cellulaire.

Nous verrons dans quelle mesure nos résultats sont applicables aux fibres du myocarde et aux fibres lisses.

I. — ETUDES SUR LES FIBRES MUSCULAIRES STRIEES

MATERIEL MUSCULAIRE

1) Le « rectus abdominis » de Grenouille qui sous-tend la partie médiane de la paroi abdominale (*fig. 12*) est formé de deux bandes symétriques par rapport au plan médio-sagittal de l'animal ; chacune de ces deux bandes est elle-même constituée par cinq faisceaux musculaires en série séparés par des aponévroses très ténues, de telle sorte qu'il n'y a pas continuité des fibres et qu'une telle préparation est peu indiquée pour les recherches électro-physiologiques.

2) Le faisceau inférieur du pectoral de Grenouille (qu'il ne faut pas confondre avec l'oblique de l'abdomen son voisin). Ce muscle, au contraire du rectus, possède une structure continue qui en fait un matériel propice aux techniques d'électrotonus en milieu liquide. Pour l'isoler dans son intégrité, on doit dégager avec soin l'insertion humérale et découper à l'autre extrémité la partie caudale du rectus sur laquelle s'attache l'insertion postérieure.

3) Le sartorius de Grenouille dont la structure se prête le mieux aux mesures de potentiel de membrane par micro-électrodes.

4) L'hémi-diaphragme de Rat avec son nerf phrénique comme préparation neuro-musculaire.

5) Le psoas de Lapin pour la préparation des « fibres au glycérol », selon SZENT-GYÖRGYI.

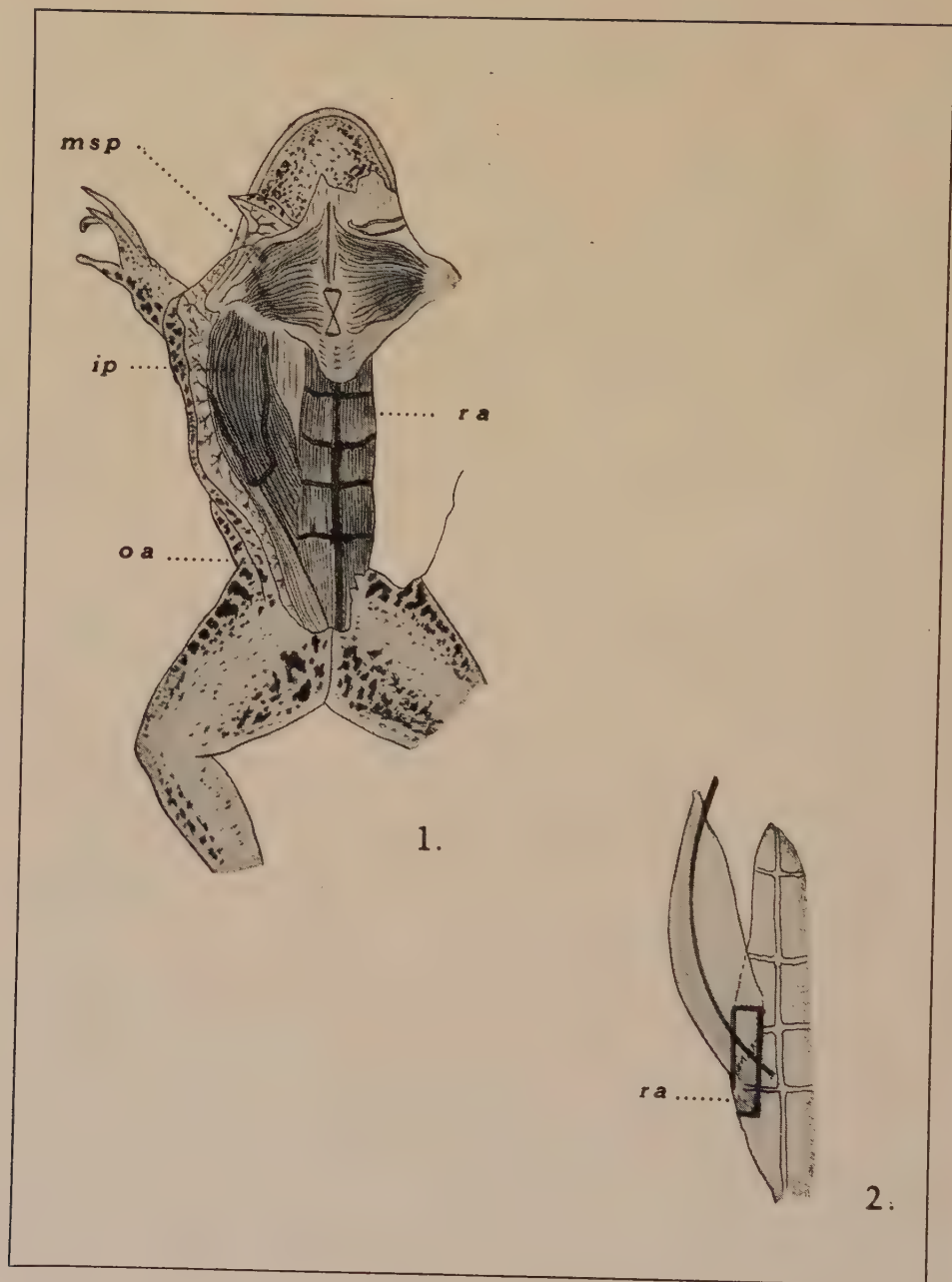


FIG. 12 : Musculature de la face ventrale de la grenouille

1 : Vue d'ensemble

2 : Insertion du faisceau inférieur du pectoral sur le muscle droit
 ip : faisceau inférieur du pectoral ; msp : faisceaux moyen et supérieur du pectoral ;
 oa : muscle oblique de l'abdomen ; ra : muscle droit de l'abdomen (*rectus abdominis*)

1) Observation du phénomène de °contracture. Réversibilité. Reproductibilité

Si, à un bain de liquide de Ringer contenant un rectus abdominis de Grenouille relié à un myographe isotonique, on ajoute de la saponine de Quillaya en quantité croissante, on observe pour une concentration dans le bain de 10^{-5} une légère contracture à progression très lente ; pour une concentration de $3 \cdot 10^{-5}$, il se manifeste une contracture plus rapide et d'amplitude déjà notable, tandis que pour une concentration de 10^{-4} , il se produit une contracture presque instantanée et maximale.

Ces contractures ne rétrocedent que partiellement et très lentement, à la suite de lavages prolongés au liquide de Ringer dépourvu de saponine. On peut obtenir une relaxation plus précoce en effectuant une traction modérée sur la préparation, mais de toute façon on n'obtient qu'une récupération fonctionnelle très incomplète, car l'addition d'une même dose de saponine ne donne qu'une contracture d'amplitude très réduite par rapport à la précédente. Ceci pourrait être attribué à un phénomène de tachyphylaxie ; cependant, l'acétylcholine voit son action également diminuée après saponine.

En faisant agir les mêmes doses que précédemment sur une préparation de phrénique-diaphragme de Rat, selon BÜLBRING (1946), on observe une contracture qui se manifeste d'abord par une élévation de la ligne de base, alors que l'amplitude des contractions obtenues par stimulation électrique du nerf reste sensiblement constante, puis la contracture poursuivant son développement, l'amplitude des contractions finit par diminuer jusqu'à s'annuler à peu près complètement.

On peut remarquer, dans ce cas, que la somme contraction + contracture a une amplitude qui dépasse celle qu'on peut obtenir par stimulation électrique maximale, ainsi que SANTESSON (1925) l'avait déjà remarqué. Il est loisible de supposer qu'on met en jeu des structures contractiles qui n'interviennent pas lors de la réponse brève à la stimulation électrique ; on peut aussi, dans ce dernier cas, expliquer l'amplitude moindre par l'inertie du levier.

Nous comparerons plus loin la contracture par la saponine au phénomène décrit par LUNDGAARD (1930 et 1931) avec l'acide monoiodacétique et auquel son nom reste attaché ; mais il faut remarquer qu'il s'agit ici de la réponse du gastrocnémien de Grenouille *in situ* à la stimulation électrique.

Si l'on fait agir, comme nous l'avons fait nous-mêmes pour vérifier, l'acide monoiodacétique sur le phrénique-diaphragme de Rat, on obtient une contraction de même type que celle de la *figure 13*,

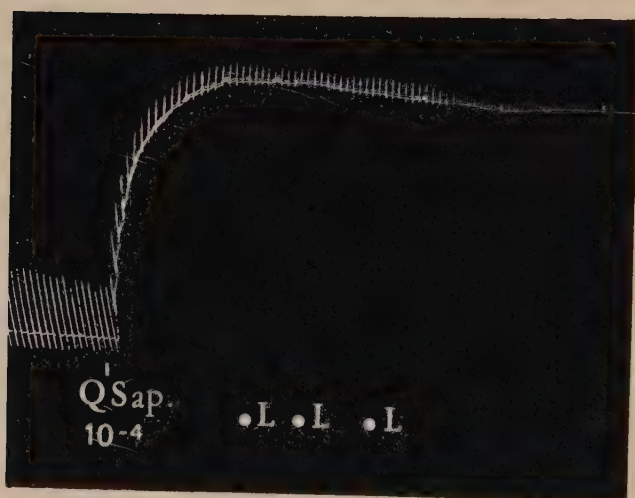


FIG. 13 : En haut : Contracture lente par une dose faible de saponine de Quillaia et relaxation temporaire sous l'effet d'un anélectrotonus

On voit que lorsque le passage du courant électrique cesse, la contracture revient à un niveau plus élevé qu'auparavant (pectoral de Grenouille, 1^{er} dispositif)

En bas : Contracture par la saponine de Quillaia d'un muscle strié en travail (pectoral de Grenouille, 2^e dispositif)

c'est-à-dire que là aussi la somme contraction + contracture dépasse l'amplitude de la contraction maximale par stimulation électrique.

De même, d'autres inhibiteurs métaboliques agissant sur le pectoral de Grenouille stimulé électriquement par une technique de stimulation directe que nous détaillerons ultérieurement, donnent des courbes de même type.

2) Essai d'analyse du phénomène de contracture des fibres striées par la saponine de Quillaya

En présence d'une action pharmacodynamique contracturante, on peut faire deux sortes d'hypothèses :

a) L'action contracturante peut être due à une intervention physicochimique directe sur les structures contractiles à base de fils orientés d'actomyosine.

b) L'action contracturante est due à une modification des propriétés de la membrane des fibres musculaires.

Nous envisagerons successivement ces deux hypothèses, puis nous étudierons sous c) l'influence de l'anoxie et de divers inhibiteurs métaboliques sur la contracture par la saponine de Quillaya pour envisager en d) le rôle des ions dans ces phénomènes.

a) ETUDE D'UNE ÉVENTUELLE ACTION PHARMACODYNAMIQUE DE LA SAPONINE DE QUILLAYA SUR LES STRUCTURES CONTRACTILES DES FIBRES MUSCULAIRES STRIÉES :

Pour étudier l'action de la saponine sur la « mécanique contractile » du muscle séparée de ses éléments d'excitation situés au niveau de la membrane cellulaire, les « fibres au glycérol » de SZENT-GYÖRGYI (1949) fournissent un matériel aisément utilisable, compte tenu des réserves que l'on peut formuler sur le caractère physiologique d'une méthode qui traite aussi brutalement la matière vivante.

Des bandelettes de fibres de psoas de Lapin sont prélevées rapidement après saignée de l'animal et plongées dans une solution de glycérol à 50 % maintenue à 0°C pendant 24 heures, puis au moins cinq jours à — 20° C.

Au bout de ce temps, on sépare des fragments de bandelette constituant des faisceaux de fibres musculaires qui, immergés dans du liquide physiologique contenant 0,25 p. 100 d'acide adénosine-triphosphorique, se contractent rapidement. Par contre, une solution contenant 10^{-4} de saponine reste sans effet sur ces fibres au glycérol, tandis qu'elle contracture fortement les mêmes fibres de psoas fraîchement prélevées sur l'animal.

Nous avons en outre vérifié que la saponine n'agit pas sur la recombinaison de l'actine avec la myosine. Pour ce faire, les fibres au glycérol sont traitées par une solution de pyrophosphate de Na 0,1 M pendant 4 minutes.

Dans ces conditions, SZENT-GYÖRGYI a montré qu'il y avait dissociation complète de ces deux protéines comme dans le muscle au repos, de telle sorte que l'addition d'A.T.P. ne provoque plus de contraction. Par contre, si avant d'ajouter l'A.T.P. on traite les fibres par une substance capable de recombinaison des deux protéines, il y aura néanmoins contraction.

Expérimentée sur des telles « fibres au glycérol dissociées au pyrophosphate », une solution de saponine à la concentration de 10^{-4} n'a provoqué aucune contraction, c'est-à-dire que l'actine et la myosine sont restées dissociées.

Il y a donc lieu de penser que la saponine n'agit pas directement sur les structures contractiles du muscle, mais que la présence de la membrane est indispensable à la genèse de la contracture.

b) DANS QUELLE MESURE L'INTERVENTION D'UNE MODIFICATION DES PROPRIÉTÉS DE LA MEMBRANE DES FIBRES MUSCULAIRES STRIÉES PEUT-ELLE EXPLIQUER LEUR CONTRACTURE SOUS L'EFFET DE LA SAPONINE DE QUILLAYA ?

Puisqu'il ne semble pas que la saponine étudiée puisse agir sur les structures contractiles elles-mêmes, force nous est de supposer un point d'attaque plus périphérique au niveau de la membrane cellulaire.

Il existe une relation évidente entre l'état de polarisation de la membrane musculaire et l'état de contracture ou de contraction. Dans le cas de la contraction rapide normale du muscle strié, la dépolarisation propagée (potentiel d'action musculaire) le long des fibres accompagne la secousse mécanique qui n'est pas simultanée sur toute la longueur de la fibre, mais également propagée et décalée dans le sens d'un retard par rapport aux phénomènes électriques (RAMSEY et STREET, 1940 et 1941 ; BUCHTAL et KNAPPEIS, 1943).

D'autre part, si l'on plonge un faisceau de fibres musculaires striées dans un bain contenant certaines substances, on peut obtenir une contracture lente et soutenue, mais pas de secousse rapide. Si l'immersion n'est que partielle, seule la partie immergée est contracturée et l'expérience montre qu'elle est seule dépolarisée, donc que cette dépolarisation ne se propage pas (GASSER, 1930 ; KUFFLER, 1946, a et b).

Il a semblé tentant de rapprocher les deux sortes de phénomènes et d'admettre qu'il y avait un rapport défini et obligé entre le potentiel de membrane et l'état de raccourcissement ou de relaxation du muscle (KATZ, 1950). De là à établir des relations mathématiques, il n'y avait qu'un pas qui fut franchi par FLECKENSTEIN et ses collaborateurs (1948 et seq.).

Cependant, il est bon de noter que certaines substances peuvent dépolariser les fibres musculaires sans qu'il ne se manifeste aucune contracture, et on a pu d'autre part provoquer des contractions musculaires en l'absence de toute trace de potentiel d'action par l'effet de brusque établissement d'une pression élevée (BROWN, 1936). Il existe donc entre la membrane et les structures contractiles un agent de transmission strictement inconnu. Cet « agent de transmission » pourrait être inhibé par les substances qui dépolarisent sans contracturer ; il serait excité par les procédés qui permettent la contraction musculaire sans manifestations électriques.

Mais si nous revenons à la saponine de Quillaya, principal objet de notre étude, on peut supposer *a priori* que la contracture qu'elle provoque a pour origine une dépolarisation. Nous en administrons ci-dessous la preuve par deux sortes d'expériences, d'abord l'effet des courants anélectrotoniques sur la contracture, ensuite les mesures directes de potentiels de membrane.

- ETUDE DE L'EFFET DES COURANTS ÉLECTROTONIQUES SUR LA CONTRACTURE MUSCULAIRE PAR LA SAPONINE DE QUILLAYA :

On sait que toute cellule vivante constitue l'équivalent d'une pile électrique, pile à vrai dire d'un type assez spécial dont le pôle positif entoure complètement le pôle négatif. Cette disposition explique qu'il faille provoquer une brèche dans le pôle positif (en l'occurrence la face externe de la membrane) pour atteindre le pôle négatif et pouvoir mesurer ainsi la f.e.m. développée entre les deux, c'est-à-dire le potentiel de membrane. En réalité, c'est la membrane elle-même qui est le générateur et qui crée la différence de potentiel par le maintien de gradients ioniques.

Pour faire varier le potentiel de membrane, on appliquera des courants électrotoniques à travers ladite membrane dans un sens ou dans l'autre, de telle sorte que la polarisation naturelle se trouve accrue ou rétablie (anélectrotonus) ou bien renversée ou seulement réduite (catélectrotonus).

On peut considérer (en première approximation seulement) que dans ces processus électrotoniques, la membrane joue le rôle d'une résistance passive qui obéit à la loi d'OHM ($V = RI$); mais seule une faible partie de I est réellement efficace.

METHODE

Premier dispositif :

Le matériel musculaire que nous utilisons est constitué par le faisceau inférieur du pectoral prélevé avec les précautions mentionnées plus haut en conservant le bout du rectus sur lequel il s'insère. Ce bout de rectus est attaché au support à organe (fig. 14), tandis que l'autre extrémité est reliée à un myographe isotonique par l'intermédiaire d'une serre-fine. L'extrémité prise dans la serre-fine est brûlée

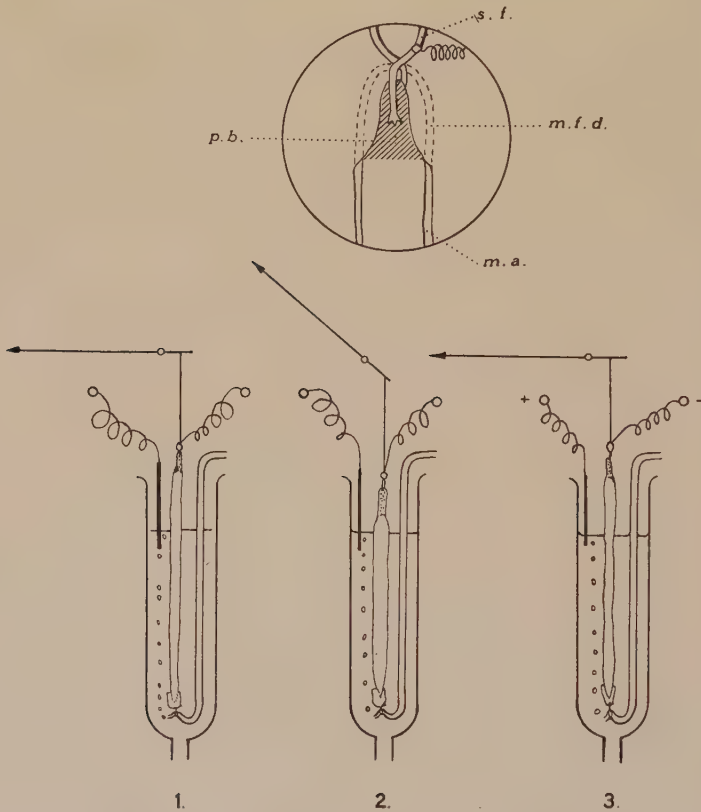


FIG. 14 : Premier dispositif pour la polarisation électrotonique des muscles

En médaillon : La partie brûlée, prise dans la serre-fine, est dépourvue de membrane active et se trouve de ce fait en liaison électrique directe avec l'intérieur de la fibre. (On a représenté une seule fibre très grosse au lieu de nombreuses fibres en parallèle, équivalentes à un shunt près).

En bas : Rapport entre la polarisation et l'état de contracture du muscle.

1 : Absence de saponine et d'électrotonus : relaxation. — 2 : Saponine : contracture.

3 : Saponine + anélectrotonus : relaxation

sf : serre-fine ; pb : partie brûlée ; mfd : membrane fonctionnellement détruite ;
ma : membrane active

en posant sur celle-ci un thermocautère ; elle est de cette façon complètement dépolarisée. La serre-fine est reliée d'autre part par un fin fil d'argent à l'extrémité négative d'une batterie d'accumulateurs après traversée d'un dispositif potentiométrique. Le pôle positif est relié au liquide du bain. Dans le sens indiqué, on réalise un anélectrotonus ; pour un catélectrotonus, les connexions sont évidemment inversées.

Un milliampèremètre est disposé en série avec la préparation, un voltmètre est placé aux bornes. (Le dispositif adopté : électrode négative sur partie brûlée a pour but d'éviter, lors de l'établissement d'un anélectrotonus, de voir une stimulation partir de la cathode, ce qui serait contraire à l'effet cherché. En effet, la partie brûlée ayant ses membranes cellulaires physiologiquement détruites, joue le rôle d'un conducteur passif et se trouve en principe en continuité électrique avec l'intérieur des fibres au même titre qu'une micro-électrode intracellulaire. Bien entendu, il ne tarde pas à se reformer une membrane active à la limite de la partie vivante.)

Deuxième dispositif (fig. 15) :

Alors que nous utilisions déjà avec fruit le dispositif ci-dessus, nous avons eu connaissance des travaux de FLECKENSTEIN (1948 et seq.) dont l'appareillage nous a semblé plus satisfaisant. FLECKENSTEIN utilise tout simplement un tube recourbé rempli de liquide physiologique dans lequel il fait pénétrer la pointe inférieure du muscle. Ce tube remplit les mêmes fonctions que notre serre-fine et, de plus, il n'est plus nécessaire de brûler l'extrémité qui y est incluse, car à cet endroit la surface de membrane offerte aux lignes de courant est relativement faible, donc la densité de courant est forte et la membrane est « forcée ».

D'autre part, dans notre méthode, la serre-fine-électrode devait être maintenue légèrement hors du bain pour éviter de court-circuiter les courants appliqués à la préparation par le liquide physiologique ; et lors d'une contraction, elle risquait néanmoins d'y tremper.

Ces réserves étant faites, nous avons pu constater que notre méthode primitive était plutôt plus sensible ; c'est-à-dire que toutes choses égales, il faut une intensité moindre pour obtenir la relaxation totale.

(Comme perfectionnement ultérieur, nous avons introduit l'usage d'électrodes impolarisables au sulfate de zinc et l'emploi d'une alimentation stabilisée en place de batterie d'accumulateurs, puis l'usage d'un stimulateur pouvant fournir des courants continus sous intensité constante quelle que soit la résistance du circuit externe par sortie sur pentode saturée ; mais ce fut après les expériences dont nous relatons ci-dessous les résultats.)

Notons, pour finir, que de tels dispositifs peuvent être utilisés pour la stimulation directe du muscle (cf. chapitre ultérieur sur l'action des inhibiteurs métaboliques). Nous avons vérifié que, dans ces conditions de stimulation, la d-tubocurarine est absolument inactive.

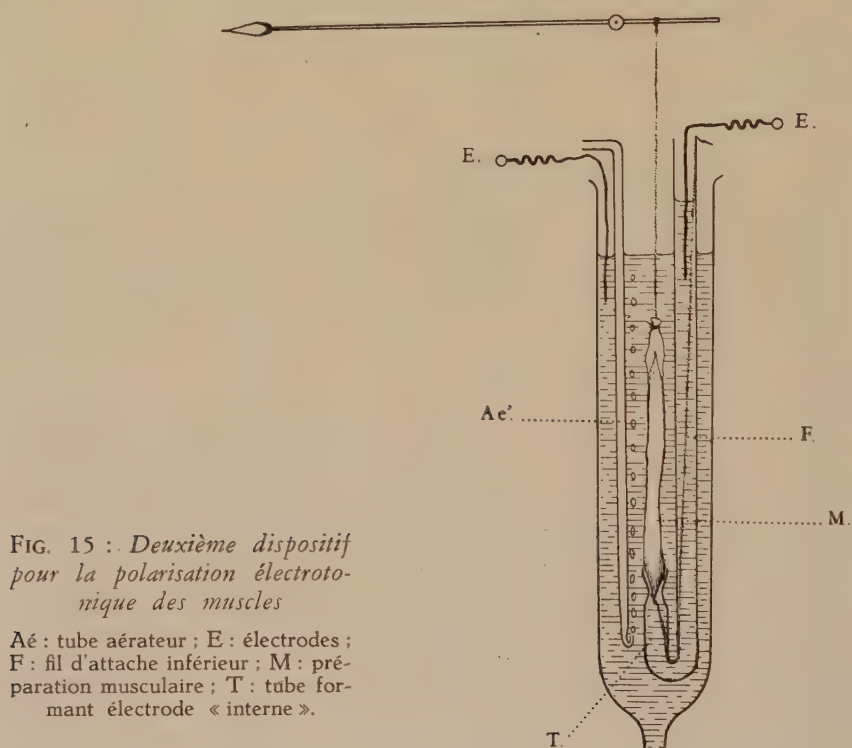


FIG. 15 : Deuxième dispositif pour la polarisation électrotonique des muscles

Aé : tube aérateur ; E : électrodes ; F : fil d'attache inférieur ; M : préparation musculaire ; T : tube formant électrode « interne ».

RESULTATS

Ayant réalisé l'un de ces deux dispositifs expérimentaux, si l'on ajoute au bain une quantité de saponine telle qu'on obtienne une concentration contracturante (10^{-5} à 10^{-4}), on note le raccourcissement progressif et permanent du muscle.

Si l'on provoque alors le passage d'un courant dans le sens voulu pour obtenir une polarisation anélectrotonique, on observe, pour une intensité suffisante, une relaxation complète du muscle.

Lorsqu'on cesse l'électrotonus, la contracture se rétablit d'elle-même immédiatement dans toute son amplitude ; elle est même généralement plus accentuée qu'auparavant (fig. 13, haut).

La contracture par la saponine a donc pour point de départ une dépolarisation de la surface des fibres musculaires, puisqu'une repolarisation temporaire provoque une relaxation synchrone.

Noter l'analogie avec les résultats de LORENTE DE NO' (1947).

- ACTION DE LA SAPONINE DE QUILLAYA SUR LE POTENTIEL DE MEMBRANE DES FIBRES MUSCULAIRES STRIÉES :

Puisque la contracture par la saponine est provoquée initialement, ainsi que nous l'avons montré plus haut de façon indirecte, par une dépolarisation de la membrane, nous avons voulu étudier plus étroitement le phénomène et mesurer l'influence de diverses concentrations de saponine sur le potentiel de membrane des fibres musculaires, mesuré par empalement d'une seule fibre à l'aide d'une micro-électrode. Nous avons utilisé dans ce but, comme matériel musculaire, le sartorius de *Rana esculenta*. Ce muscle, fine bandelette qui sous-tend la face inférieure de la cuisse, présente l'avantage d'être mince et transparent. De plus, sa face interne n'est recouverte que d'un conjonctif rare et lâche, de sorte que sur cette face les fibres musculaires sont facilement abordables.

La technique utilisée dérive étroitement de celle décrite par LING et GÉRARD (1949, *a* et *b*), modifiée par NASTUK et HODGKIN (1950). Le dispositif expérimental est constitué (fig. 16) :

- par une double cuve en plexiglas dont les deux compartiments communiquent par un petit tunnel juste assez grand pour laisser passage au sartorius, et qui porte deux supports réglables dont l'un pince l'aponévrose iliaque et l'autre un fil attaché au tendon du genou. La cuve elle-même est fixée sur une lame de microscope qui constitue le fond d'un des deux compartiments. Chacun de ces derniers est muni d'une électrode d'argent chloruré gélosée protégée par un fin tube de polyéthylène et insérée dans un trou de la paroi des cuves ;
- par une microélectrode du type micropipette obtenue en éti- rant du tube de verre pyrex de 3 mm de diamètre et emplie de KCl 3 M par ébullition prolongée, puis fixée par un tube de polyéthylène de diamètre convenable sur un tube de verre de même diamètre empli de KCl 3 M et contenant un fil d'argent chloruré. Ce tube de verre est lui-même porté par le bras d'un micromanipulateur simplifié (MONCHABLOND).

Les mesures de potentiel sont effectuées entre la microélectrode et l'électrode du compartiment antérieur. Des stimulations peuvent être appliquées entre les deux électrodes qui se trouvent chacune dans un des deux compartiments.

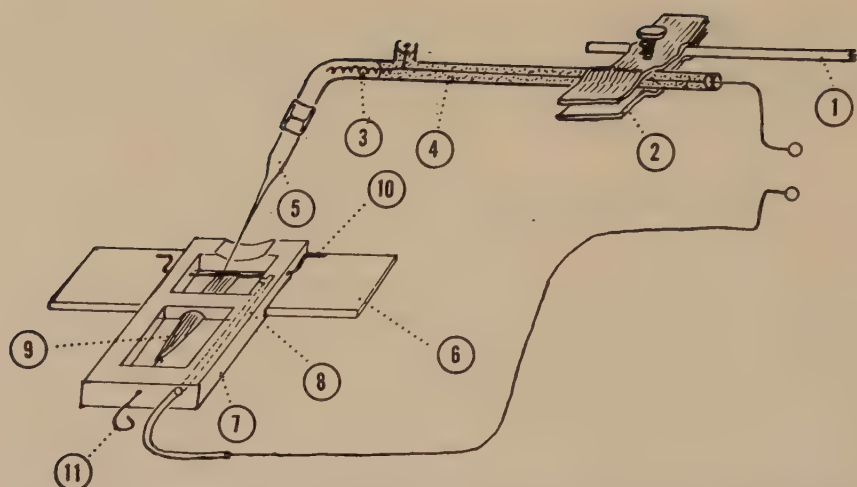


FIG. 16 : *Dispositif imité de Nastuk et Hodgkin (1950) pour l'emplacement des fibres musculaires à l'aide d'une microélectrode*

1: bras du micromanipulateur ; 2: pince ; 3: fil d'argent chloruré dans KCl 3M ; 4: paraffine ; 5: microélectrode emplie de KCl 3M ; 6: lame de microscope formant le fond du petit compartiment ; 7: cuve en plexiglas ; 8: électrode indifférente: fil d'argent chloruré dans un tube de polyéthylène empli de solution de Ringer gélifiée ; 9: sartorius (face interne vers le haut) ; 10 et 11: pince avant et crochet arrière, tous deux en argent

Contrairement à la technique originelle de LING et GÉRARD, nous attaquons la fibre tangentiellement, de telle sorte que l'on puisse bien voir au microscope la pointe de la microélectrode et faciliter sa pénétration. Lorsque l'empalement est bien exécuté et qu'il n'y a pas de court-circuit notable au niveau du trou de pénétration dans la fibre, on peut modifier légèrement la position de la microélectrode sans observer le moindre changement du potentiel.

Pour effectuer la lecture du potentiel de membrane dérivé ainsi qu'il vient d'être dit, il faut bien entendu un instrument à grande impédance d'entrée, eu égard à l'énorme résistance interne du générateur que constitue la fibre ou plutôt sa membrane. Nous utilisons la partie millivoltmètre d'un multimesureur « ERIC » dont la sensibilité a été augmentée par adjonction d'un millivoltmètre plus sensible à la sortie et en stabilisant le courant de secteur qui l'alimente par un dispositif à résonance et fer saturé (Réguvolt). L'appareil agit uniquement comme transformateur d'impédance, son rapport d'amplification étant égal à 1. Le constructeur indique 50.000 Mégohms comme impédance d'entrée. Nous estimons obtenir 5.000 Mégohms avec sécurité (ce qui suffit d'ailleurs).

Les résultats sont rassemblés dans les courbes de la *figure 17*.

Si l'on compare la courbe de dépolarisation en fonction du temps à la courbe de raccourcissement du muscle pour la même concentra-

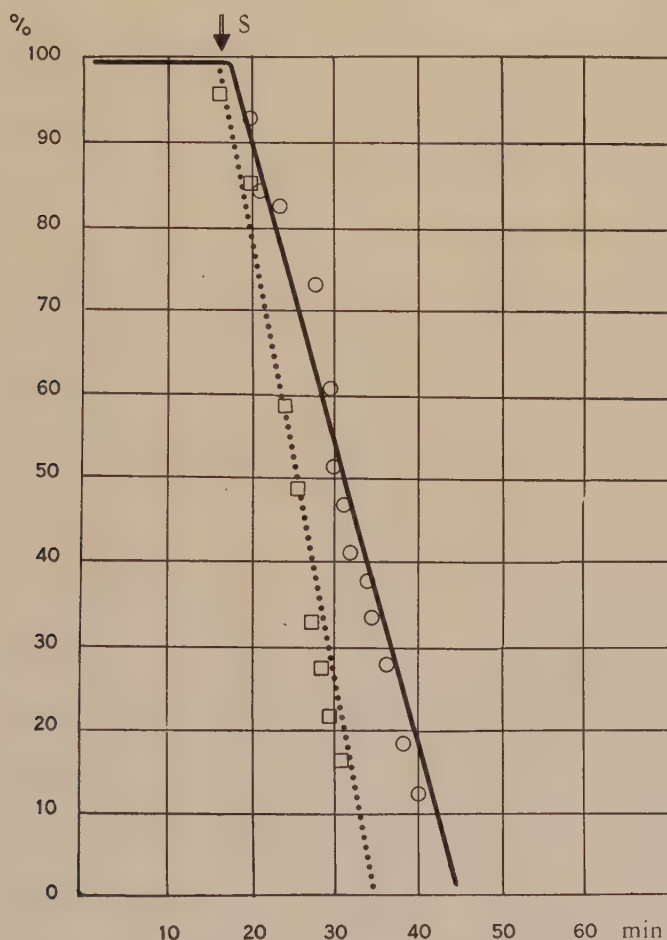


FIG. 17 : Action de la saponine du *Quillaya* (10^{-4}) sur le potentiel de membrane des fibres striées (2 préparations)

Ordonnées : potentiel de membrane en pourcentage du potentiel initial. Abscisses : temps en minutes. En S, on ajoute la saponine

tion, on constate que la contracture est beaucoup plus rapide que la dépolarisation. Le potentiel de membrane n'a eu le temps de baisser que de 5 mV environ que déjà la contracture est maximale. Cette

constatation s'inscrit en faux contre l'opinion que l'état de contraction est directement lié au potentiel de membrane. Il faut admettre alors qu'une fraction de ce potentiel, faible, mais qualitativement déterminante, suffit lorsqu'elle est annulée pour déclencher la contraction totale.

La figure 17 montre que la dépolarisation est très sensiblement linéaire, mais il est difficile d'en tirer des conclusions quant à la nature physicochimique du phénomène. Par contre, si l'on connaissait l'évolution en fonction du temps des gradients intéro-externes de concentration des principaux ions responsables du maintien du potentiel de membrane, il serait particulièrement intéressant de comparer l'évolution desdits gradients à celle du potentiel de membrane global. Nous pensons que l'emploi des isotopes radioactifs conjugué à celui de la photométrie de flamme pourrait permettre une telle étude.

Du point de vue purement méthodologique, la technique d'empalement des fibres par une microélectrode n'est pas exempte, dans le cas qui nous occupe, de quelques critiques. On sait, en effet, que lorsqu'on introduit la microélectrode à travers la membrane de la fibre, on crée une brèche qui est obturée par l'électrode elle-même. Cependant, entre la pipette-électrode et les bords du trou, il reste encore un shunt dont la résistance est loin d'être infinie.

Pour avoir des mesures valables, il faut que la résistance de ce shunt soit très grande par rapport à la résistance interne du générateur que constitue la membrane. La conductance du shunt est proportionnelle à la section non obturée, c'est-à-dire vraisemblablement à la grosseur de la pipette-électrode. L'expérience montre d'ailleurs qu'on ne peut avoir de bonne mesure qu'avec une électrode suffisamment fine. Les précautions ci-dessus énumérées étant prises, si l'on fait agir sur la préparation une substance provoquant une chute du potentiel mesuré, on considère habituellement que c'est la membrane qui a été touchée et non le shunt. Il n'en va plus forcément de même dans le cas où la substance dépolarisante est un composé tensioactif susceptible de faciliter le passage des ions à travers une paroi poreuse et l'on peut admettre qu'une partie au moins de la baisse de potentiel observée est due à un phénomène de cet ordre.

Nous ne croyons pas, toutefois, que cette critique enlève toute validité à nos mesures ; en effet, force nous est bien d'admettre indirectement que la saponine présente une action dépolarisante sur le muscle, ne serait-ce que sur la foi de nos propres expériences qui montrent que la contraction par la saponine est levée par un électrotonus anodique.

Nous avons tenu cependant à signaler que l'emploi de substances tensioactives pose fréquemment des problèmes méthodologiques nou-

veaux et que des techniques éprouvées peuvent se trouver en défaut (cf. notre partie physiochimique en ce qui concerne les méthodes de dilution des saponines).

Dans le cas bien précis qui nous occupe, une méthode qui consisterait à mesurer la différence de potentiel entre deux électrodes au calomel posées à chaque extrémité d'une bandelette musculaire, ne tomberait pas sous le coup de la méthode précédente.

- INFLUENCE DE L'ANOXIE ET DE CERTAINS INHIBITEURS MÉTABOLIQUES SUR LA CONTRACTURE PAR LA SAPONINE :

La courbe de contracture saponinique du muscle strié peut être rapprochée plus étroitement de la courbe « canonique » de l'effet Lundsgaard (voir plus haut).

De plus, la contracture est nettement accélérée si l'on fait travailler le muscle par stimulation électrique, en même temps qu'on le soumet à l'action de la saponine.

Il s'imposait donc de faire l'hypothèse que la saponine pouvait agir par inhibition des processus normaux de glycolyse tout comme on l'admet pour l'acide monoiodacétique.

Influence de l'anoxie :

Nous avons utilisé le dispositif d'électrodes décrit plus haut *figure 15*, selon FLECKENSTEIN, pour stimuler cathodiquement une préparation de pectoral inférieur de Grenouille. Les deux muscles symétriques du même animal ont été disposés côte à côte dans la même cuve et reliés chacun à un myographe isotonique.

L'un est stimulé à la fréquence de 1 stimulus toutes les deux secondes ; l'autre n'est pas stimulé.

Dans ces conditions, si l'on ajoute de la saponine de Quillaya au bain à la dose (modérée) de $3 \cdot 10^{-5}$, on voit la contracture se développer sur les deux muscles ; un peu plus rapidement du côté stimulé. Par lavage, on obtient une relaxation satisfaisante des deux préparations, car à cette dose la contracture est assez réversible. On arrête alors le barbotage d'air et, après une minute d'attente, on ajoute la saponine (pour atteindre une concentration de 10^{-4}).

La contracture enregistrée est minime pour le muscle en travail, nulle pour le muscle en repos, tandis que dans les conditions usuelles, la dose de 10^{-4} provoque la contracture maximale.

Le rétablissement de l'air provoque dès les premières bulles l'apparition de l'énorme contracture habituelle, tant sur la préparation qui travaille que sur celle au repos, mais de façon plus marquée dans le premier cas (*fig. 18*).

Nous devons signaler toutefois que beaucoup de préparations musculaires sont très résistantes à l'anoxie et qu'on a parfois beaucoup de mal à empêcher par ce moyen la contracture par la saponine ; on n'a souvent qu'un effet partiel, c'est-à-dire que la contracture subsiste en partie pendant l'anoxie, mais qu'elle retrouve toute son amplitude lors du rétablissement de l'oxygénation.

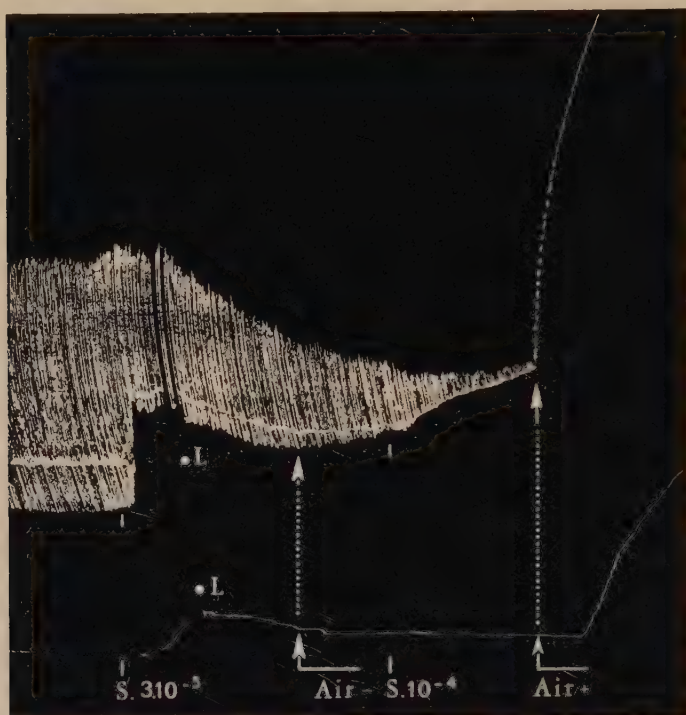


FIG. 18 : Effet de l'anoxie sur la contracture
par la saponine de Quillaya

Deux préparations de pectoral de Grenouille sont placées dans la même cuve ; l'une est stimulée électriquement. Une faible dose de saponine est ajoutée au bain ; on observe des contractures. Si l'on supprime l'aération, une forte dose de saponine reste sans effet notable. Le retour de l'aération déclenche pour chaque préparation musculaire la contracture très accentuée, réponse habituelle à cette dose

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de GARRY (1928) sur les muscles lisses. Cet auteur a pu montrer qu'à la suite d'une anoxie sévère, les organes isolés à fibres lisses cessaient de répondre aux agents pharmacodynamiques.

Influence des inhibiteurs métaboliques :

Nous avons essayé quelques substances réputées telles (cf. GÉRARD et DOTY, 1950) :

- le dinitrophénol (30 mg/cm³) (fig. 19);
- l'azothydrate de sodium (N₃Na) (10 mg/cm³) (fig. 20);
- le cyanure de sodium (10 mg/cm³) (fig. 21).

Toutes ces substances n'ont réduit dans des proportions notables la contracture par la saponine que dans la mesure où les doses qui intervenaient étaient assez importantes pour manifester elles-mêmes une action contracturante.

Après la contracture, il peut se manifester une relaxation. C'est à cet instant que nous faisons agir la saponine. Même pour ces doses élevées, l'action de la saponine n'est pas toujours complètement inhibée.

On a vu, d'autre part ci-dessus, qu'une anoxie même relative peut suffire à diminuer dans une grande proportion la contracture par la saponine.

De même, GODEAUX (1949), par abaissement de la température à 2°, a pu, sur le sartorius de *Rana temporaria* stimulé électriquement, dissocier deux composantes de l'action de l'acide monobromacétique. En effet, à + 2°C, on a bien sous l'effet de cette substance une décroissance de l'amplitude des contractions induites électriquement, mais la contracture ne se manifeste pas.

Il faut réchauffer la préparation à la température ordinaire pour retrouver la contracture de l'effet Lundsgaard.

Dans un cas comme dans l'autre, il semble bien que ce soit une inhibition métabolique qui empêche la contracture de se manifester. Il est donc possible de dire que la contracture du muscle strié par la saponine de Quillaya met en jeu des phénomènes métaboliques, tout comme l'effet Lundsgaard, et que dans ce sens elle a tous les caractères d'une « contracture du type classique », selon GODEAUX (1950). Il serait sans doute imprudent d'avancer que cette contracture résulte elle-même de phénomènes d'inhibition. SANTESSON (1925) suppose que l'acide lactique formé dans la phase anaérobie de la réaction de Pasteur-Meyerhof est soustrait à la phase aérobie de récupération par suite de l'augmentation de perméabilité de la membrane à cet acide qui peut ainsi diffuser au dehors.

Il explique du même coup pourquoi la quantité d'acide lactique retrouvée dans le bain après action de la saponine est bien plus importante que celle qu'on trouve après téτανisation. Cette explication, séduisante à son époque, ne saurait être maintenant prise en considération.



FIG. 19 (ci-contre) : Effet du dinitrophéno
sur le muscle strié en travail

On observe une contracture suivie d'une relaxa-
tion partielle. La saponine de Quillaya n'agit plus
la stimulation électrique est également inefficace
(pectoral de Grenouille, 2^e dispositif)

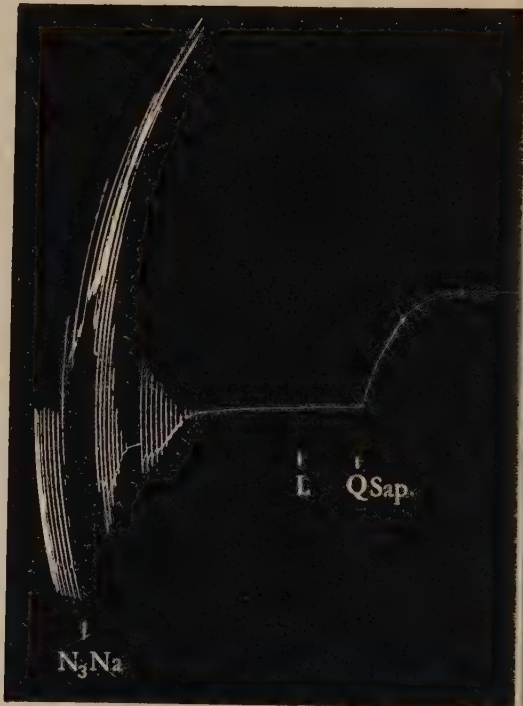


FIG. 20 (ci-dessus) : Action de l'azothydrate de
sodium sur le muscle strié en travail

L'amplitude de la contraction induite électrique-
ment reste sensiblement constante pendant la
contracture ; ce n'est qu'au décours de celle-ci
que l'amplitude baisse brusquement après une
phase transitoire d'augmentation
(pectoral de Grenouille, 2^e dispositif)



FIG. 21 (ci-contre) : Action du cyanure de
sodium sur le muscle strié en travail

La stimulation électrique n'est plus efficace, la
saponine est encore faiblement contracturante
(pectoral de Grenouille, 2^e dispositif)

• RÔLE DES ÉCHANGES IONIQUES DANS LA CONTRACTURE PAR LA SAPONINE DE QUILLAYA :

L'ensemble des faits expérimentaux exposés jusqu'ici à propos de la saponine de Quillaya, comme aussi les hypothèses de travail destinées à interpréter ces faits, nous amènent plus ou moins directement à considérer la contracture du muscle strié par cette saponine comme le résultat d'une perméabilisation aux ions.

L'étude précise de la modification des échanges ioniques par la membrane de la fibre striée sous l'influence de la saponine demanderait, pour se situer au niveau des résultats actuellement considérés comme acquis en ce qui concerne ces mêmes échanges ioniques dans les circonstances physiologiques, des possibilités expérimentales qui nous ont fait défaut.

Nous résumerons cependant quelques expériences dans ce sens.

1° Essais de contracture en milieu isotonique dépourvu de sels minéraux ionisés : nous avons lavé des préparations de rectus abdominis de Grenouille par des solutions isotoniques d'urée et de glucose dans l'eau bidistillée. Les organes étaient ensuite fixés dans une cuve contenant la même solution et les mouvements éventuels enregistrés par myographie isotonique. De la saponine était ajoutée pour obtenir une concentration de 10^{-4} (en solution dans l'eau bidistillée).

On observe la même contracture qu'en milieu physiologique.

2° Dans une autre série d'expériences, on plonge l'organe dans un liquide salin contenant un excès d'ions calcium : on a toujours la même contracture qu'en milieu physiologique.

Ces deux résultats suggèrent que ce n'est pas l'entrée d'un ion moins concentré dans le sarcoplasme que dans le bain qui provoque la contracture, mais plutôt la sortie d'un ion plus concentré à l'intérieur. On ne peut évidemment suivre le même procédé pour montrer qu'il s'agit de l'ion K^+ ; car si l'on réalise dans le bain la même concentration en ions K^+ que dans le sarcoplasme, on a une contracture immédiate.

3° La d-tubocurarine, inhibiteur de dépolarisation des jonctions myoneurales, n'empêche pas la contracture par la saponine, ce qui n'a rien pour nous surprendre, mais confirme qu'il ne s'agit pas là d'une action ayant pour point de départ la plaque motrice, mais la membrane musculaire « banale ».

DISCUSSION

Un point important nous semble être la parenté formelle de la contracture du muscle strié par la saponine et celle obtenue dans l'effet Lundsgaard.

Dans les deux cas, on observe à la fois une diminution progressive de l'amplitude de la réponse à la stimulation électrique (allant jusqu'à l'absence totale de réponse) et le développement d'une contracture pratiquement irréversible. :

De façon similaire, GODEAUX (1949) est arrivé à dissocier les deux manifestations ci-dessus à base température pour l'effet Lunds-gaard, comme nous-mêmes avons pu le faire par l'anoxie dans le cas de la saponine.

LIU, HSU et FENG (1948) ont observé, dans le cas de l'effet Lunds-gaard, une dépolarisation à progression lente qu'ils ont attribuée au départ des ions K^+ s'échappant des cellules en grande quantité.

De même, il est tentant de considérer dans le cas de la saponine, que c'est le départ d'ions K^+ qui déclenche la contracture.

Est-ce à dire que la saponine de Quillaya doit entrer dans le cadre des composés « lunds-gaardisants » ? Nous ne le pensons pas. Dans le cas de l'effet Lunds-gaard, l'inhibition métabolique porte certes sur les phénomènes dispensateurs d'énergie aux mécanismes contractiles, mais aussi sur ceux qui assurent l'imperméabilité dynamique de la membrane avec dépense d'énergie.

Si la « pompe à sodium », par exemple, ne reçoit plus d'énergie, le potentiel de membrane baisse immédiatement et le potassium sort.

Dans le cas de la saponine, la perméabilisation aux ions ne serait pas due, selon toute vraisemblance, à une inhibition métabolique, mais à une perméabilisation physicochimique tellement grande que les processus de transport actif ne peuvent plus s'effectuer efficacement. Autrement dit, la « pompe » recevrait bien l'énergie requise, mais les « soupapes » ne fonctionnant plus, son travail resterait dépourvu de toute efficacité.

II. — ETUDES SUR LES FIBRES MUSCULAIRES LISSES

Nous dirons peu de choses des muscles lisses qui, qualitativement, se comportent vis-à-vis de la saponine de Quillaya comme les muscles striés.

La saponine, par exemple, provoque la contracture de l'iléon isolé de Cobaye. Cette contracture est immédiate et maximale pour 10^{-4} ; elle est liminaire pour 10^{-5} . Pour les faibles doses, la contracture est lente et s'apparente à celle qu'on obtient sur le muscle strié.

Toutefois, la relaxation survient assez facilement après quelques lavages ; comme le muscle strié, le muscle lisse traité par une dose

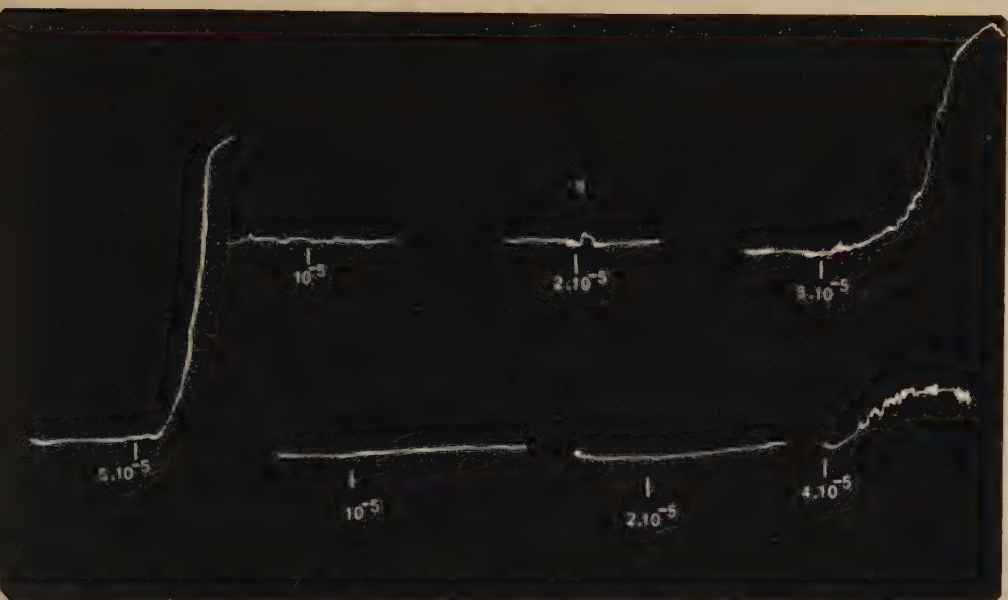


FIG. 22 : Contraction d'un fragment d'ileon de Cobaye
par des doses variables de saponine de Quillaia

Bien que la contracture des muscles lisses apparaisse comme beaucoup plus facilement réversible que celle des muscles striés, les effets des mêmes doses sont rarement identiques sur une même préparation

de saponine, puis lavé, réagit à la même dose par une contracture d'amplitude moindre, mais après un temps de récupération de quelques minutes à quelques dizaines de minutes, il retrouve sa réactivité initiale, de telle sorte qu'on peut faire un véritable dosage biologique de la saponine en prenant quelques précautions (*fig. 22*).

Il semble, à la lumière de ces faits, que le muscle lisse possède des échanges ioniques réglés par des phénomènes de « transport actif » très énergiques, capables de lutter efficacement contre la dépolariisation par la saponine.

Mais on peut encore interpréter cette plus grande résistance à la saponine par l'hypothèse que la perméabilisation est moindre pour des doses égales. Dans ce cas, il faudrait admettre que la structure de la membrane n'est pas identique pour les deux catégories de fibres musculaires et que les éléments biochimiques réglant la perméabilité sont ou qualitativement ou quantitativement différents et de toute façon diversement affectés.

III. — ETUDES SUR LE MYOCARDE

La parenté structurale de certaines saponines avec les cardiotoniques digitaliques, ainsi qu'une certaine similitude de propriétés physicochimiques et physiologiques, ont amené depuis longtemps les chercheurs à étudier l'action des saponines (et notamment de celle de Quillaya) sur le cœur.

Sur le cœur isolé de Grenouille, on observe pour de fortes doses ($2 \cdot 10^{-5}$) un arrêt immédiat en systole, ce qui est l'équivalent de la contracture observée sur les autres muscles. L'analogie se poursuit encore plus étroitement pour les doses modérées où l'on obtient la contracture en même temps qu'une diminution de l'amplitude des battements. L'aspect du tracé est tout à fait semblable à ceux que donnent les muscles striés stimulés électriquement (KAKOWSKI, 1905 ; KOBERT, 1904 ; DE BOER et FRÖHLICH, 1919). Les auteurs notent quelques similitudes d'action avec les digitaliques, mais aussi des différences, notamment quant aux variations de sensibilité suivant les espèces animales. Ils admettent la nature purement musculaire de la contracture, puisque l'atropine et la vératrine sont impuissantes à la prévenir. D'après les derniers cités, ils ont vu que l'électrogramme au galvanomètre à corde traduit l'arrêt de l'activité électrique en même temps que l'arrêt de l'activité mécanique.

GOTTDENKER et ROTHBERGER (1937) ont noté cinq phases successives dans l'action de la saponine (de saponaire) sur le cœur de Grenouille :

- 1° Phase d'excitation.
- 2° Ralentissement, diminution d'amplitude, dilatation ventriculaire.
- 3° Ratatinement du ventricule surtout à la pointe, oreillettes dilatées.
- 4° Arrêt en systole ventriculaire, oreillettes dilatées.
- 5° L'arrêt devient irréversible par lavage.

BLUMENCRON (1941) a mis en évidence l'action inhibitrice de doses sous-liminales préalables (phénomène analogue à la tachyphylaxie, mais avec cette différence que la sensibilité originelle ne réapparaît pas avec le temps).

Nous avons retrouvé les différentes phases observées par GOTTDENKER et ROTHBERGER, la phase initiale d'excitation étant parfois difficile à mettre en évidence. Nous avons enregistré, de plus, l'activité électrique du cœur mis à nu sur l'animal entier (*Rana esculenta*) avec un amplificateur à grande constante de temps relié à un oscilloscope cathodique. La saponine en solution dans du liquide de Ringer est injectée dans la veine médiane abdominale dans laquelle est placé un cathéter de polyéthylène.

Dans l'ensemble, l'électrocardiogramme évolue parallèlement au mécanogramme, les modifications mécaniques précèdent toutefois nettement les modifications de l'activité électrique :

- à la phase 1° (accélération), rien n'apparaît sur l'E.C.G. ;
- à la phase 2°, on note un allongement des espaces P-R et R-T et une diminution de R ;
- à la phase 3° (ratatinement du ventricule) correspond une augmentation de l'onde T qui aboutit à une monophasie de base ; à ce moment, la base bat encore faiblement ;
- aux phases 4° et 5°, on n'a plus qu'une onde P (diffusion du complexe auriculaire et une très faible onde T inconstante. Le ventricule est arrêté.

On note un aspect peu différent sous l'action de la digitaline, si ce n'est la classique inversion de l'onde T que je n'ai pas toujours retrouvée et qui peut aussi s'observer avec la saponine ; comme pour le muscle strié, on note l'apparition d'une contracture qui commence à la pointe du cœur et s'accompagne d'un progressif bloc de conduction.

La contracture peut donc être attribuée là aussi à une dépolarisation.

Peut-être n'est-il pas interdit de penser que les digitaliques agissent de façon similaire, mais en limitant leur action aux premières phases.

Une revue comparative de cette question a été écrite par LENDLE (1951) qui compare aussi les actions extra-cardiaques des saponines et des glucosides cardiotoniques (qui sont très actifs sur l'intestin isolé).

CONCLUSION GENERALE

Les divers chapitres de ce mémoire ne prétendent pas épuiser la pharmacodynamie des saponines ni même celle de la saponine de Quillaya.

Beaucoup de points intéressants mériteraient sans doute des recherches plus approfondies et ceci dans les chapitres mêmes que nous avons étudiés.

Parmi ceux qui ont été délibérément laissés de côté, il faut reconnaître au rein l'intérêt particulier de posséder des structures filtrantes « passives » et des éléments capables de « transport actif ».

Quoi qu'il en soit, nous pensons pouvoir affirmer qu'il ressort de nos recherches que la saponine de Quillaya agit avant tout par augmentation de la perméabilité aux substances hydrosolubles et tout particulièrement aux ions minéraux.

Cet accroissement se manifeste aussi bien en ce qui concerne la perméabilité intercellulaire que la perméabilité de la membrane cellulaire. Cette modification de la perméabilité de la membrane est due assez vraisemblablement à une action sur le cholestérol. Il ne semble pas que ce stérol soit arraché de la membrane par la saponine, comme il est probable que cela se produit avec certains mouillants synthétiques capables de « dissoudre » les cristaux de cholestérol *in vitro*, ce qui expliquerait leur action toxique sur les cellules. Tout au plus l'édifice complexe lipido-protidique de la membrane peut-il être remanié par les modifications d'orientation moléculaire dues à l'acquisition par le cholestérol d'une certaine mouillabilité sous l'influence de la saponine.

L'action de la saponine sur la substance cyto-cimentaire mériterait à elle seule une étude détaillée sur des « modèles » glucido-lipidiques, étude que nous croyons susceptible d'apporter quelque lumière sur la structure physicochimique de cette substance inconnue dont on

imagine assez l'importance dans la pharmacodynamie de la perméabilité et de la résistance des vaisseaux capillaires.

Nous espérons que notre travail pourra contribuer à montrer aux chercheurs l'intérêt de ces quelques problèmes physiologiques et pharmacodynamiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRIBAT (M.) et DOGNON (A.) (1939). — Mesure de la tension superficielle par la méthode statique de la lame dépolie. *C.R. Acad. Sci.*, **208**, 1881-1882.
- ABRIBAT (M.) et DOGNON (A.) (1941). — Mesures des tensions interfaciales par la méthode de la lame immergée. *C.R. Acad. Sci.*, **212**, 854-855.
- ABRIBAT (M.) (1942). — Nouvelle méthode de séparation et de fractionnement par essorage de mousses. (Symposium jubilaire de Henri Devaux : « Les phénomènes de mouillabilité et leurs applications ».) *Actualités Scientifiques et Industrielles*, Paris, Hermann, n° 932, p. 123.
- AEBY (Ch.) (1865). — Ueber den feineren Bau der Blutcapillaren. *Centralbl. f. d. Med. Wissenschaften*, **3**, 209-210.
- ALFEROW (S.) (1874). — Nouveaux procédés pour les imprégnations à l'argent. *Arch. de Physiol.*, (2° sér.), **1**, 694-697.
- ARDRY (R.) (1950). — Sur le sort des fractions globuliniques du plasma au cours de la délipidation. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 375-381.
- ARDRY (R.) et FONTAINE (Mlle) (1951). — Sur la délipidation du sérum. 1) Influence de la délipidation sur le bilan protéinique. Caractère particulier de la β -lipoprotéine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1497-1503.
- ARIENS (E.J.), SIMONIS (A.M.) et DE GROOT (W.M.) (1955). — Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive and non competitive inhibition and an analysis of some forms of dualism in action. *Arch. Inter. Pharmacod.*, **100**, 298-322.
- ASTRUP (T.), FISCHER (A.) et VOLKERT (M.) (1945). — Protein metabolism of tissue cells *in vitro*. 2) Accessory growth substances in animal and vegetable tissues. *Acta Physiol. Scand.*, **9**, 134-161.
- ATLASS (J.) (1888). — Ueber Senegin. *Arbeit. d. Pharmakol. Inst. zu Dorpat.*, **1**, 57-99.
- AUERBACH (L.) (1865). — Uber den Bau der Lymph-und Blut Capillaren. *Centralbl. f. d. med. Wissenschaften*, **3**, 177-179.

- BALANSARD (J.) et BERNARD (P.) (1947). — Saponines et protides (note préliminaire). *Ann. Pharm. Fr.*, **5**, 163-164.
- BARNES (J.M.) et DUFF (J.I.) (1954). — The action of 2, 4 dinitrophenol on mammalian striated muscle. *J. of Physiol.*, **124**, 37 P.
- BICHAT (X.) (1812). — Anatomie générale, tome I, pp. 137-159 dans l'édition de 1900 (Steinheil, Paris).
- BISCHOF (B.), JAEGER (O.) et RUZICKA (L.) (1949). — Zur kenntnis der Triterpene. (143^e Mitteilung). Über die Lage der Zweiten sekundären Hydroxylgruppe in Echinocystsäure, Quillayasäure, Maniladiol und Genin A (aus *Primula officinalis*, Jacquin) Über die Konstitution der Oleanolsäure. *Helv. Chim. Acta*, **32**, 1911-1921.
- BLANQUET (P.) et TAYEAU (F.) (1947). — Recherches sur les mélanges sérums-sels biliaires. *Bull. Soc. Biol.*, **29**, 683-689.
- BOGROS (J.A.) (1827). — Mémoire sur la structure des nerfs. *Répertoire général d'anatomie et de Physiologie*, **4**, 63-73.
- BOQUIET (P.) et DELAUNAY (A.) (1942). — Réaction du mesentère de Cobaye au venin et à l'anavenin de *Vipera aspis*. *C.R. Soc. Biol.*, **136**, 320-321.
- BRANDL (J.) (1906). — Über Sapotoxin und Sapogenin von *Agrostemma githago*. (Anhang : Über die Sapogenine von Quillayasäure und Quillayasapotoxin.). *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol.*, **54**, 245-284, p. 269.
- BROWN (D.E.S.) (1936). — Effect of rapid Compression on Events in the isometric Contraction of skeletal Muscle. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **8**, 141-157.
- BUCHTAL (F.) et KNAPPEIS (G.G.) (1943). — Propagation of contraction in the isolated striated muscle fibre. *Acta Physiol. Scand.*, **5**, 256-270.
- BÜLBRING (E.) (1946). — Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the Rat. *Brit. J. Pharmacol.*, **1**, 38-61.
- BUNGENBERG DE JONG (H.G.) (1936). — La coacervation. Les coacervats et leur importance en biologie. *Actual. Scient. et Ind.*, n° 397 et 398 (Hermann).
- BUSSY (A.) (1833). — Recherches chimiques sur une racine connue dans le commerce sous le nom de Saponaire d'Égypte. *J. de Pharm. et Sci. Acc.*, **19**, 1-15.
- CAVIER (R.) (1943). — Contribution à l'étude de l'hémolyse par les sels alcalins des acides gras et de quelques-uns de leurs dérivés. *Thèse de Sciences*, Paris.
- CHAMBERS (R.) et ZWEIFACH (B.W.) (1940). — Capillary endothelial cement in relation to permeability. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **15**, 255-272.
- CHAMBERS (R.) et ZWEIFACH (B.W.) (1944). — Topography and functions of the mesenteric capillary circulation. *Am. J. Anat.*, **75**, 173-300.
- CHAMBERS (R.) et ZWEIFACH (B.W.) (1947). — Intracellular cement and capillary permeability. *Physiol. Revs.*, **27**, 436-463.

- CLARA (M.) (1936). — Vergleichende Histobiologie des Nierenglomerulus und der Lungenalveole. *Z. Mikr. Anat. Forsch.*, **40**, 147-280.
- CLARA (M.) (1955). — Morphologic problems of the capillary walls. *Bull. Fac. Méd. Istambul.*, **18**, 117-133.
- CORABOEUF (E.) et THIEULIN (R.) (1952). — La sensibilité au pH et à l'anhydride carbonique du nerf myélinisé privé de sa gaine conjonctive. *C.R. Soc. Biol.*, **146**, 190-194.
- CRESCITELLI (F.) (1951). — Nerve Sheath as a Barrier to the Action of certain Substances. *Am. J. Physiol.*, **166**, 229-240.
- DANIELLI (J.F.) et STOCK (A.) (1944). — The structure and permeability of blood capillaries. *Biol. Rev.*, **19**, 81-94.
- DAVSON (H.) et DANIELLI (J.F.) (1943). — The permeability of natural membranes. Cambridge, University Press.
- DAY (T.D.) (1947 a). — Connective Tissue cementing Substance. *Nature (London)*, **159**, 100-101.
- DAY (T.D.) (1947 b). — The nature and significance of the cementing substance, in interstitial connective tissue. *J. Path. Bact.*, **59**, 567-573.
- DAY (T.D.) (1952). — The permeability of interstitial connective tissue and the nature of the interfibrillary substance. *J. Physiol.*, **117**, 1-8.
- DE BOER (S.) et FRÖHLICH (A.). — Die elektrischen Erscheinungen während der Kontractur des Froschherzens. *Arch. Exp. Path. u Pharm.*, **84**, 273-281.
- DEFRISE (A.) (1930). — Recherche anatomotopografiche e microscopiche sui vasi linfatici dei nervi. *Arch. Gen. di Neurol. Psych. e Psicoanal.*, **11**, 102-117.
- DELEZENNE (C.) et FOURNEAU (E.) (1914). — Constitution du phosphatide hémolytant (lysocithine) provenant de l'action du venin de cobra sur le vitellus de l'œuf de poule. *Bull. Soc. Chim.*, (4^e s.), **15**, 421-434.
- DEMPSEY (E.L.W.), BUNTING (H.), SINGER (M.) et WISLOCKI (G.B.) (1947). — The dye-binding capacity and other chemo-histological properties of mammalian mucopolysaccharides. *Anat. Rec.*, **98**, 417-429.
- DERVICHIAN (D.G.) (1946). — Remarques sur la nature de certaines associations moléculaires. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28**, 433-434.
- DERVICHIAN (D.G.) et MAGNANT (C.) (1947). — Formation et conditions d'existence des coacervats contenant des protéines. 2) Coacervation par association de protéines avec d'autres colloïdes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **29**, 660-666.
- EBERTH (C.J.) (1865). — Erste Abhandlung über den Bau der Blutcapillaren der Wirbelthiere. *Würzburg. Naturwiss. Zschr.*, **6**, 27-32.
- EHRENTHEIL (O.) et WEIS-OSTBORN (W.) (1923). — Untersuchungen über Eiweiss und lipöide mit Hilfe der Saponinhämolyse. *Zeitsch. f. Immunitätsforsch., u. Exper. Ther.*, **36**, 1, 356-367.

- EISLER (M.) (1906). — Über die Bedeutung der Lipoide für die antihämolytische Wirkung des Serums. *Z. Exper. Path. u. Ther.*, **3**, 296-313.
- ELIAS (H.) (1953). — The myth of the intercellular cement and capillary permeability. *Chicago Med. Sch. Quarterly*, **14**, 57-59.
- EMIROGLU (F.) (1955). — The permeability of the peripheral nerve sheath in frog. *Arch. Intern. Physiol.*, **63**, 161-180.
- EULER (U.S. von) et STJARNE (L.) (1955). — Studies on the release of the adrenergic neurotransmitter from perfused ox spleen. 2) Effect of various membrane active substances. *Acta Physiol. Scandin.*, **33**, (sup. 118), 70-74.
- FABRE (R.) et SIMONNET (H.) (1926). — Etude de l'action sensibilisatrice de l'hématoporphyrine. *J. de Pharm. et de Chim.*, **4**, 294-305.
- FENG (T.P.) et LIU (J.M.) (1949). — The connective tissue sheath of the nerve as effective diffusion barrier. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**, 1-16.
- FLECKENSTEIN (A.) (1948). — Über den primären Energiespeicher der Muskelkontraktion. *Pflügers Archiv.*, **250**, 643-666.
- FLECKENSTEIN (A.), HILLE (H.) et ADAM (W.E.) (1950). — Aufhebung der Kontraktur-Wirkung depolarisierender Katelektrotonica durch Repolarisation im Anelektrotonus. *Pflügers Archiv.*, **253**, 264-282.
- FLECKENSTEIN (A.), JANKE (J.) et LECHNER (G.) (1954). — Zerfällt ATP bei Muskelkontraktion? *Pflügers Archiv.*, **259**, 246-266.
- FLECKENSTEIN (A.) et RICHTER (F.) (1953). — Weitere Untersuchungen über die Aufhebung der Kontrakturwirkung von Acetylcholin, Cholin, Neurin, Nicotin, Coniin, Veratrin, Kaliumchlorid und Rubidiumchlorid durch den Anelektrotonus. *Pflügers Archiv.*, **257**, 1-11.
- FLECKENSTEIN (A.), WAGNER (E.) et GOGGEL (K.H.) (1950). — Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit der Muskellänge vom Membran Potential. *Pflügers Archiv.*, **253**, 38-54.
- FLEXNER (S.) et NOGUCHI (H.) (1903). — The constitution of snake venoms and snake sera. *J. of Path. a Bact.*, **8**, 396-410.
- GARRY (R.C.) (1928). — The effect of oxygen lack on surviving smooth muscle. *J. Physiol.*, (London), **66**, 235-248.
- GASSER (H.S.) (1930). — Contractures of skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, **10**, 35-109.
- GERARD (R.W.) et DOTY (R.W.) (1950). — Nerve conduction without increased Oxygen Consumption: The Action of Azide and Fluoracetate. *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 115-117.
- GERSH (I.) et CATCHPOLE (H.R.) (1949). — The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *Am. J. Anat.*, **85**, 457-521.
- GESSNER (G.) (1943). — Über chemische und physicochemische. Bedingungen der Saponinbindung an biologischen und anorganischen Substrat. *Dissert. Münster.*

- GIBBS (W.) (1876). — On the Equilibrium of Heterogeneous Substances. The condition of internal and external equilibrium for solids in contact with fluids with regard to all possible states of strain of the solids. *Trans. Conn. Acad. Scien. Arts*, **3**, 108-248 et 341-524.
- GODEAUX (J.) (1949). — Action de la température sur le comportement du muscle de Grenouille intoxiqué par le monobromacétate. *Arch. Intern. Physiol.*, **56**, 199-206.
- GODEAUX (J.) (1950). — Signification de l'effet Lundsgaard, ses rapports avec les substances thioloпрives. *J. Physiol.*, (Paris), **42**, 901-937.
- GOTTENKER (F.) et ROTHBERGER (C.J.) (1937). — Über die Wirkung von Saponin auf das Froschherz. *Arch. f. Exper. Path. u. Pharmacol.*, **186**, 185-194.
- GRIGAUT (A.) (1910). — Procédé colorimétrique de dosage de la cholestérine dans l'organisme (note préliminaire). *C.R. Soc. Biol.*, **68**, 791-793.
- GUYOT (J.) (1924). — Effet volta métal-électrolyte et couches monomoléculaires. *Ann. de Physique* (10), **2**, 506-638.
- HALPERN (B.N.) et NEVEU (Th.) (1955). — Action of the histamine releaser P.V.P. on capillary permeability in dogs. *Brit. J. Pharmacol.*, **10**, 223-229.
- HARDY (W.B.) et GARDINER (S.) (1910). — Proteins of blood plasma. *J. of Physiol.*, **40**, Proc. lxviii.
- HARINGTON (C.R.) et SCOTT (D.A.) (1929). — XLVI. Observations in insulin. Part. I. Chemical observations. *Biochem. J.*, **23**, 384-409.
- HATTORI (K.) (1921). — Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. *Biochem. Zeitschr.*, **119**, 45-64.
- HEWITT (L.F.) (1927). — Optical rotary power and dispersion of proteins. *Biochem. J.*, **21**, 216-224.
- HOLM-JENSEN (in KROGH) (1946). — The active and passive exchanges of inorganic ions through the surfaces of living cells and through living membranes generally. *Proc. Roy. Soc., B* **133**, 140-200.
- HOPE-SEYLER (F.) (1870). — Article « Cholesterin » dans le *Handbuch der Physiologisch und Pathologisch Chemischen Analyse...*, p. 199 de la 6^e édition (1893).
- HOTCHKISS (R.D.) (1948). — A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. of Bioch.*, **16**, 131-141.)
- HOYER (H.) (1865). — Ein Beitrag zur Histologie bindegewebiger Gebilde. *Arch. f. Anat. Physiol. u. Wissensch. Med.*, 204-245 (p. 244).
- HUECK (K.) (1935). — Ueber die Neubildung des Grundhaütchens in den Blutcapillaren. *Virchow's Archiv.*, **296**, 416-421.
- JAHNSON-BLOHM (G.) (1913). — Ueber den Einfluss von Cholesterin auf die Hämolyse. *Z. Physiol. Chem.*, **85**, 59-67.

- JAKOBSON (C.A.) (1919). — Alfalfa saponin. Alfalfa investigation. *J. Amer. Chem. Assoc.*, **41**, 640-648.
- JARISCH (A.) (1922). — Beiträge zur pharmakologie der Lipoide. II) Seife und Serum. *Pflügers Archiv*, **194**, 337-351.
- JERMSTAD (A.) et WAALER (T.) (1953). — Ueber Zuckeranteil des Gypsophila-saponins. *Pharm. Acta Helvetiae*, **28**, 120-123.
- KAKOWSKI (Dr) (1905). — Ueber den direkten Einfluss verschiedener Substanzen auf das Herz. *Arch. Intern. Pharmacod.*, **15**, 21-140 (p. 115).
- KATZ (B.) (1950). — In: Discussion on muscular Contraction par HILL (A.V.). *Proc. Roy. Soc. B.*, **137**, 40-87 (pp. 45-47).
- KENNEDY (W.P.) (1925). — XLVIII. The influence of blood serum and of sugar on haemolysis. *Biochem. J.*, **19**, 318-321.
- KEPPLER (Fr.) (1878). — Die acute Saponinvergiftung und die Bedeutung des Saponins als lokalen Anästheticums, durch das physiologische Experiment an sich selber untersucht. *Berl. Klin. Wochenschr.*, **15**, 475-477 et 511-514.
- KEY (A.) et RETZIUS (G.) (1876). — Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. Stockholm (in RANVIER, 1878).
- KITASATO (Z.) et SONE (C.) (1932). — Ueber die Konstitution des Hederagenins und der Oleanolsäure. *Acta Phytochimica*, **6**, 179-222 et 223-225.
- KOBERT (R.) (1887). — Ueber Quillajasäure. Ein Beitrag zur Kenntnis der Saponingruppe. *Arch. f. Exper. Path. u. Pharmacol.*, **23**, 233-272.
- KOBERT (R.) (1904). — Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart, F. Enke.
- KOBERT (R.) (1916). — Neue Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. I. Stuttgart, F. Enke.
- KOBERT (R.) (1917). — Neue Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. II. Stuttgart, F. Enke.
- KOFLER (L.) (1922). — Die oberflächenaktivität und die Giftwirkung der Saponine. Ein Beitrag zur Kenntnis der Beziehungen zwischen physiologischer. Wirkung und physikalischer Eigenschaften. *Bioch. Zeitschr.*, **129**, 64-72.
- KOFLER (L.) (1927). — Die Saponine. Wien, Julius Springer.
- KOFLER (L.), FISCHER (R.) et NEWSELY (H.) (1929). — Ueber den Nachweis von Saponinen in Arzneimitteln und Lebensmitteln. *Arch. der Pharm.*, **267**, 685-699.
- KOFLER (L.) et RAUM (H.) (1930). — Ueber die Fällbarkeit verschiedener Saponine durch Sterine. *Biochem. Zeitschr.*, **219**, 335-340.

- KOFLER (L.) et SCHRUTKA (W.) (1925). — Vergleichende Untersuchungen über die Toxizität der Saponine und die Entgiftung durch Cholesterin. *Biochem. Zeitschr.*, **159**, 327-336.
- KÖHLER (H.) (1873). — Die lokale Anästhesierung durch Saponin. Halle (in KEPLER, 1878).
- KROGH (A.) (1937). — Animal membranes. *Trans. of Faraday Soc.*, **33**, 912-919.
- KRUSKAL (N.) (1891). — Ueber einige Saponinsubstanzen. *Arbeit. d. Pharmakol. Inst. zu Dorpat*, **6**, 89-148.
- KUFFLER (S.W.) (1946). — Relation of electric potential changes to contracture in skeletal muscle. *J. Neurophysiol.*, **9**, 367-377.
- KUFFLER (S.W.) (1947). — Membrane changes during excitation and inhibition of the contractile mechanisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **47**, 767-779.
- LANDIS (E.M.) (1927). — Micro-injection studies of capillary permeability. II) The relation between capillary pressure and the rate of which fluid passes through the walls of single capillaries. *Am. J. Physiol.*, **82**, 217-238.
- LAPICQUE (L.) et LAPICQUE (M.) (1910). — Détermination de la chronaxie par décharge de condensateurs. *C.R. Soc. Biol.*, **68**, 797-799.
- LASCH (F.) (1938). — Die Ultrafiltration als Modellversuch zum Nachweis der resorptionsfördernden Eigenschaft von Saponinen. *Biochem. Zeit.*, **297**, 209-213.
- LAUTENBACH (B.F.) (1879). — Saponin, in its relations to physiology. *J. Nerv. a. Ment. Diseases*, **6**, 262-291.
- LEBLOND (C.P.) (1950). — Distribution of periodic acid-reactive carbohydrates in the adult rat. *Amer. J. Anat.*, **86**, 1-49.
- LENDLE (L.) (1951). — Wirkungsbedingungen von Digitalisglykosiden und Saponinen auf glattmuskelige Organe. *Arneimittelforsch*, **1**, 104-107.
- LEVENE (P.A.), ROLF (I.P.) et SIMMS (H.S.) (1924). — Lysolecithins and lysocephalins. II) Isolation and properties of lysolecithins and lysocephalins. *J. of Biol. Chem.*, **58**, 859-871.
- LEWIS (F.T.) (1949). — The analogous shapes of cells and bubbles. *Proc. Amer. Acad. Arts a. Sci.*, **77**, 147-186.
- LIEBERMANN (C.) (1885). — Ueber das Oxychinoterpen. *Ber. d. d. Chem. Gesellsch.*, **18**, 1803-1809, p. 1804.
- LING (G.) et GERARD (R.W.) (1949 a). — The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**, 383-396.
- LING (G.) et GERARD (R.W.) (1949 b). — The membrane potential and metabolism of muscle fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**, 413-438.

- LIU (Y.M.), HSU (C.H.) et FENG (T.P.) (1948). — Electrical potential change accompanying the development of Rigor in Iodoacetat poisoned muscle. *Nature*, London, **162**, 962.
- LOOS (R.) (1953). — Electrophorèse sur papier des saponines. *J. de Pharm. Belg.*, **8**, 292-293.
- LORENTE DE NO' (R.) (1941). — A study of nerve physiology. *Studies from Rockefeller Inst. Med. Res.*, **131** et **132**.
- LORENTE DE NO' (R.) (1950). — The ineffectiveness of the connective tissue sheath of nerve as a diffusion barrier. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**, 195-240.
- LUNDGAARD (E.) (1930). — Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. *Biochem. Zeitsch.*, **217**, 162-177.
- LUNDGAARD (E.) (1930). — Weitere Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. *Biochem. Zeitsch.*, **227**, 51-83.
- LUNDGAARD (E.) (1931). — Ueber die Bedeutung der Arginin Phosphorsäure für den Tätigkeitsstoffwechsel der Crustaceenmuskeln. *Biochem. Zeit.*, **230**, 10-18.
- MACHEBCEUF (M.) (1928). — Recherches sur les lipides, les stérols et les protéides du sérum et du plasma sanguins. *Thèse Doct. Sci. Paris*.
- MACHEBCEUF (M.) (1947), cité dans LOISELEUR. — Techniques de laboratoire. Paris, Masson.
- MACHEBCEUF (M.) et SANDOR (G.) (1932). — Etude de l'extraction du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool. *C.R. Acad. Sci.*, **194**, 1102-1104.
- MACHEBCEUF (M.) et SANDOR (G.) (1932). — Recherches sur la nature et la stabilité des liaisons protéides-lipides du sérum sanguin. Etude de l'extraction des lipides par l'éther en présence d'alcool. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **14**, 1168-1190.
- MC MANUS (J.F.A.) (1948). — Structure of the glomerulus of the human kidney. *Amer. J. Path.*, **24**, 1259-1269.
- MC MANUS (J.F.A.) et CASON (J.E.) (1950). — Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. I) Periodic acid methodes. *J. of Exper. Med.*, **91**, 651-654.
- MAN (E.B.) et PETERS (J.P.) (1933). — Permeability of capillaries to plasma lipoids. *J. Clin. Invest.*, **12**, 1031-1039.
- MANTELL (L.) (1932). — Injection of peripheral nerves from the subarachnoid space. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **30**, 192-193.
- MEYER (K.) (1908). — Ueber den Mechanismus der Saponinhämolyse. *Beitr. z. Chem. Physiol. u. Pathol.*, **11**, 357-364.
- MEYER (K.H.) et ODIER (M.) (1946). — Contribution à l'étude de l'acide chondroïne-sulfurique. *Experientia*, Basel, **2**, 311-312.

- MEYER (K.H.), ODIER (M.E.) et SIEGRIST (A.E.) (1948). — Constitution de l'acide chondroïtine-sulfurique. *Helv. Chim. Acta*, **31**, 1400-1419.
- MEYER (K.H.) et RAPPORT (M.M.) (1951). — The polysaccharides of the ground substance of connective tissue. *Science*, Lancaster, **113**, 596-599.
- MEYERHOF (O.) (1926). — Ueber die Enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. I) *Biochem. Zeitschr.*, **178**, 395-418.
- MEYERHOF (O.) (1926). — II) Die Spaltung der Polysaccharide und der Hexosediphosphorsäure. *Biochem. Zeitschr.*, **178**, 462-490.
- MEYERHOF (O.) (1927). — III) Die Milchsäurebildung aus den gärfähigen Hexosen. *Ibid.*, **183**, 176-215.
- MÜLLER (G.) (1953). — Untersuchungen über den Durchtritt des Fe^{++} ions durch die Gefäßwand. *Anat. Anz.*, **100**, 12-21.
- NAGEL (F.) (1938). — Ueber die Saponinhämolyse ihre Grundlagen und Anwendbarkeit zum Nachweis der Lipoide im Liquor. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, **148**, 70-83.
- NASTUK (W.L.) et HODGKIN (A.L.) (1950). — The electrical activity of single muscle fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**, 39-73.
- NEUMAYER (L.) (1908). — Ueber die Wirkung des Sapotoxins von *Agrostemma Githago* auf Blut und tierische Gewebe. *Arch. f. Exptl. Path. u. Pharmacol.*, **59**, 311-320.
- OELSSNER (W.) (1949). — Zur Frage der Permeabilitätsbeeinflussung durch Saponine und Digitalisglykoside. *Arch. f. Exptl. Path. u. Pharmacol.*, **208**, 201-204.
- OVERTON (E.) (1913). — Studien über einige Wirkungen der Saponine. (E.P.) *Lund Universitets Arsskrift. N.F.*, **9** (n° 7), 1-27.
- PACHORUKOW (D.) (1888). — Ueber Sapotoxin. *Arbeit. d. Pharmacol. Inst. zu Dorpat*, **1**, 1-56.
- PAPPENHEIMER (J.R.) (1953). — Passage of molecules through capillary walls. *Physiol. Rev.*, **33**, 387-423.)
- PAPPENHEIMER (J.R.) et SOTO-RIVERA (A.) (1948). — Effective osmotic pressure of the plasmatic proteins and other quantities associated with the capillary circulation in the hind limb of cats and dogs. *Amer. J. Physiol.*, **152**, 471-491.
- PELIKAN (E.) (1867). — Sur un nouveau mode d'action des poisons; paralysie locale produite par la saponine et les corps identiques. (*Gazette Médicale de Paris*, n° 45, **22** (3^e sér.), 687-689.
- PERETZ (L.H.) (1929). — Ueber die biologische Lipoidreaktion. *Z. Immunitätsforsch.*, **61**, 387-396.
- PLENK (H.) (1927). — Ueber argyrophile Fasern (Gitterfasern) und ihre Bildungszellen. *Erg. Anat.*, **27**, 302-412.

- POLICARD (A.) (1952). — Précis d'histologie physiologique (4^e éd.), p. 509. Paris, Doin édit.
- PONDER (E.) (1923). — The inhibitory effect of blood serum on haemolysis. *Proc. Roy. Soc., London, B* **95**, 42-61.
- PONDER (E.) et HYMAN (C.) (1943). — Cytolytic effect of saponin on walls of vessels. *Amer. J. Physiol.*, **138**, 432-438.
- PONOMAREW (A.W.) (1928). — Zur Frage der Pathogenese des Tetanus und des Fortbewegungsmechanismus des tetanustoxins längs dem Nerven. *Zeitschr. f. d. Ges. Experim. Med.*, **61**, 97.
- PORT (F.) (1910). — Die Saponinehämolysen und ihre Hemmung durch das Serum. *Dtsch. Arch. f. Klin. Medizin.*, **99**, 259-271.
- RAMSEY (R.W.) et STREET (S.F.) (1940). — The isometric length-tension diagram of isolated skeletal muscle fibres of the frog. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **15**, 11-34.
- RANSOM (F.) (1901). — Saponin und sein Gegengift. (*D. Med. Wochenschr.*, **27**, 194-196.
- RANVIER (L.) (1878). — Leçons sur l'histologie du système nerveux. Paris, Savy.
- RÉGNIER (J.) et QUEVAUVILLER (A.) (1938). — Etude quantitative de l'action des anesthésiques locaux sur le nerf isolé, par la mesure de la chronaxie et par celle de l'expression énergétique de l'excitabilité. Troisième mémoire : Utilisation du chronaximètre de précision de L. Lapicque — Mesure de la résistance du segment nerveux. Expression de l'excitabilité par la formule énergétique selon H. Lassalle et L. Lapicque. *Journ. Physiol. et Path. Gén.*, **36**, 1021-1035.
- ROSSIGNOL (P.) (1954). — Action de la saponine de Quillaya sur les vaisseaux capillaires. *Arch. Anat. Microsc. et Morph. Expér.*, **43**, 117-136.
- RUYSSEN (R.) (1942). — Bestimmung der Oberflächenaktivität von Saponinen. *Kolloidzeitschrift*, **101**, 170-174.
- RUYSSEN (R.) et VERSTRAETE (M.) (1937). — Les coacervats complexes du système gélatine-saponine. *Bull. Cl. Sci. Acad. Roy. Belg.*, **23** (n° 8-9), 739-748.
- RUZICKA (L.), JAEGER (O.), REDEL (J.) et VOLLI (E.) (1945). — Introduction de groupes cétoniques et de doubles liaisons dans les noyaux B et C de l'amyrine. *Helv. Chim. Acta*, **28**, 199-209.
- SANDOW (A.) et SCHNEYER (C.A.) (1955). — Mechanics of iodacetate rigor of muscle. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **45**, 131-136.
- SANNIÉ (C.) (1948). — Les saponosides (saponines). *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, **9**, 174-223.
- SANTESSON (C.G.) (1925). — Ueber die Muskelwirkung von Saponinen nebst einigen Bemerkungen über europäische Polygaladrogen. *Skand. Arch. f. Physiol.*, **47**, 78-101.

- SARKAR (N.K.) (1951). — Action mechanism of cobra venom, cardiotoxin and allied substances on muscle contraction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **78**, 469.
- SCHEID (W.) (1941). — Untersuchungen über Zerfall der Liquorzellen *in vitro*. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, **152**, 170-201.
- SCHMIDT-THOME (J.) (1942). — Ueber die Hemmung der Digitoninhämolyse durch Serum. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **275**, 208-214.
- SCHULMAN (J.H.) et RIDEAL (E.K.) (1937). — Molecular interaction in monolayers.
I) Complexes between large molecules. *Proc. Roy. Soc. B.*, **122**, 29-45.
II) The action of haemolytic and agglutinating agents on lipoprotein monolayers. *Proc. Roy. Soc. B.*, **122**, 46-57.
- SCHATZMANN (H.J.) (1953). — Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natriumtransport durch die Erythrocyten membran. *Helv. Physiol. Acta*, **11**, 346-354.
- SCOTT (D.A.) et GLAISTER (D.) (1929). — The action of saponin on antitoxin. *J. Biol. Chem.*, **84**, 475-485.
- SOKOLOFF (B.) (1949). — In CLARA (1955).
- SORENSEN (S.P.L.) (1930). — The constitution of soluble proteins (reversibly dissociable component systems). *C.R. Lab. Carlsberg*, **18** (n° 5), 1-124.
- STARY (Z.) et TEKMAN (S.) (1951). — Ueber die klinische und pathologische Bedeutung der Hyaluronidasen. *Münch. Med. Wschr.*, **93**, 1511-1516 et 1517-1556.
- STRAUB (W.) (1922). — Ueber Digitalisstoffe und Digitalismedikamente. *Dtsch. Med. Wschr.*, 791-793.
- STURM (H.) (1947). — Die Permeabilität der Gefäße. II* Mitt. Die Resorption. *Pflügers Archiv.*, **249**, 480-493.
- SULLIVAN (W.E.) et MORTENSEN (O.A.) (1934). — Visualization of the movement of a brominized oil along peripheral nerves. *Anat. Record*, **59**, 493-501.
- SZENT-GYÖRGYI (A.) (1949). — Free energy relations on contraction of actomyosin. *Biol. Bull.*, **96**, 140-161.
- TAYEAU (F.) (1941). — Sur l'état du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction des cénapses cholestéro-protéidiques par les saponines. *C.R. Acad. Sci.*, **212**, 575-576.
- TAYEAU (F.) (1944). — Nouvelles recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des cénapses cholestéro-protéidiques en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C.R. Soc. Biol.*, **138**, 423-424.
- TAYEAU (F.) (1950 a). — Sur le « décollement » du cholestérol sérique par certains saponosides. *Méd. Tropic.*, **10**, 841-843.

- TAYEAU (F.) (1950 b). — A propos du dosage du cholestérol sérique par la méthode aux saponosides. *Ann. Biol. Clin.*, **8**, 602-603.
- TAYEAU (F.) (1957). — Etat et rôle du cholestérol circulant. *Biol. Clin.*, **15**, 177-194.
- TAYEAU (F.) et NIVET (R.) (1955). — Un nouvel inhibiteur de l'estérification du cholestérol sérique : les saponosides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 635-642.
- TROMSDORFF (1832). — In KOFLER (1927), p. 4.
- TUFANOW (N.) (1888). — Ueber Cyclamin. *Arbeit. d. Pharmakol. Inst. zu Dorpat*, **1**, 100-145.
- VALETTE (G.) (1944). — L'action antihémolytique du sérum sanguin vis-à-vis des savons, des sels biliaires et de la saponine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **26**, 478-480.
- VALETTE (G.) et CAVIER (R.) (1938). — L'action de quelques savons alcalins, des sels biliaires et du digitonoside sur les mélanges de lécithine et de cholestérol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, 1256-1264.
- VALETTE (G.), RUCART (G.) et COHEN (Y.) (1957). — Application de la perfusion vasculaire de l'intestin du Rat à l'étude de la valeur de divers succédanés du plasma. *Arch. Intern. Pharmacod.*, **109**, 354-368.
- VERSTRAETE (E.O.K.) et GRASSMANN (I.) (1943). — Ueber die Diffusionskonstante und die Teilchengrösse des saponins der weissen Seifenwurzel (Sapoalbin). *Kolloidzeitschrift*, **105**, 114-118.
- VILLEDIEU (A.M.) (1939). — Contribution expérimentale à l'étude physiologique des saponines et notamment de la saponine de *Dumoria Heckeli*; (A. CHEV.) Sapotacées. Clermont-Ferrand. *Thèse Doct. Pharm. Univ. Toulouse*.
- WALLACE (G.B.) et BRODIE (B.B.) (1939). — The distribution of iodide, thiocyanate, bromide and chloride in the central nervous system and spinal fluid. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **65**, 220-234.
- WALLACE (G.B.) et BRODIE (B.B.) (1940). — The passage of bromide and thiocyanate into and out of the cerebrospinal fluid. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **68**, 50-55.
- WEINBERG (F.) (1919). — Ueber die Wirkung der Saponine und Sapogenine auf das isolierte Kaltblüterherz. *Zeitschr. f. Exper. Path. u. Ther.*, **20**, 153-214.
- WINDAUS (A.) (1909). — Ueber die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. *Ber. d. Dtsch. Chem. Ges.*, **42**, 238-246.
- WINTERSTEIN (E.) et BLAU (H.) (1911). — Beiträge zur Kenntnis der Saponine. *Zeitschr. Physiol. Chem.*, **75**, 410-442.
- WINTERSTEIN (E.) et MAXIM (M.) (1919). — Untersuchungen über Saponine. *Helv. Chim. Acta*, **2**, 195-203.

- WISLOCKI (G.B.), BUNTING (H.) et DEMPSEY (E.W.) (1947). — Metachromasia in mammalian tissue and its relationship to mucopolysaccharides. *Amer. J. Anat.*, **81**, 1-37.
- ZWEIFACH (B.) (1934). — A micromanipulative study of blood capillaries. *Anat. Rec.*, **59**, 83-108.
- ZWEIFACH (B.W.) (1948). — Microscopic observations of circulation in Rat mesoappendix and Dog omentum: use in study of vasotropic substances. *Methods in Medical Research*, **1**, 131-139. Chicago, R. Potter et coll. édit., Yearbook publ. Co.
-

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	1
— <i>Note sur les substances utilisées</i>	6

Partie physico-chimique

Action de la saponine de Quillaya sur le cholestérol	11
— <i>Travaux antérieurs</i>	11
— <i>Travaux personnels</i>	12
Recherches physico-chimiques sur l'interaction en milieu aqueux des saponines et des colloïdes plasmatiques ou de leurs substituts	22
— <i>Travaux antérieurs concernant la liaison entre les saponines et les protides</i>	23
— <i>Travaux personnels</i>	26

Partie pharmacodynamique

Action de la saponine de Quillaya sur les structures endothélioïdes	41
— <i>Travaux antérieurs</i>	41
— <i>Travaux personnels</i>	42
— <i>Recherches utilisant l'épinèvre</i>	42
— <i>Recherches concernant l'action de la saponine de Quillaya sur les vaisseaux capillaires</i>	52
— <i>Discussion sur le mode d'action de la saponine au niveau des structures endothélioïdes</i>	65
Action de la saponine de Quillaya sur les fibres musculaires	69
— <i>Travaux antérieurs</i>	69
— <i>Travaux personnels</i>	71
— <i>Etudes sur les fibres musculaires striées</i>	71
— <i>Etudes sur les fibres musculaires lisses</i>	90
— <i>Etudes sur le myocarde</i>	92
Conclusion générale	95
Références bibliographiques	97

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Le rôle des médiateurs chimiques
dans le fonctionnement gastro-intestinal.**

Vu et approuvé :

Paris, le 17 novembre 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE

